



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**VANDBERGUE SANTOS PEREIRA**

**EFEITO DE MOLÉCULAS DE *QUORUM SENSING* EXÓGENAS E TERPINEN-4-  
OL SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Sporothrix* spp. E  
DESENVOLVIMENTO DE *PLUGIN* PARA ANÁLISE DE BIOFILMES FÚNGICOS**

**FORTALEZA**

**2021**

**VANDBERGUE SANTOS PEREIRA**

**EFEITO DE MOLÉCULAS DE *QUORUM SENSING* EXÓGENAS E TERPINEN-4-  
OL SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Sporothrix* spp. E  
DESENVOLVIMENTO DE *PLUGIN* PARA ANÁLISE DE BIOFILMES FÚNGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

**FORTALEZA**

**2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

P496e Pereira, Vandbergue Santos.

Efeito de moléculas de quorum sensing exógenas e terpinen-4-ol sobre células planctônicas e biofilmes de *Sporothrix* spp. e desenvolvimento de plugin para análise de biofilmes fúngicos/ Vandbergue Santos Pereira. – 2021.

160 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

1. Percepção de Quorum. 2. Biofilmes. 3. Software. 4. *Sporothrix*. I. Título.

CDD 616.9

---

**VANDBERGUE SANTOS PEREIRA**

**EFEITO DE MOLÉCULAS DE *QUORUM SENSING* EXÓGENAS E TERPINEN-4-  
OL SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Sporothrix* spp. E  
DESENVOLVIMENTO DE *PLUGIN* PARA ANÁLISE DE BIOFILMES FÚNGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana e Animal.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Raimunda Sâmia Nogueira  
Brilhante (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Anderson Messias Rodrigues  
Universidade Federal de São Paulo

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Terezinha do Menino Jesus Silva  
Leitão  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raquel Oliveira dos Santos  
Fontenelle  
Universidade Estadual do Ceará

A Deus,  
A minha família.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pois creio que nenhuma folha na terra caixa sem seu conhecimento e permissão. A ele que rege e entende qual o melhor caminho para seus filhos, entende nossas dores e nunca nos desampara. A quem as vezes não entendemos os desafios impostos na vida, que por vezes pensamos não serem justos, mas que possuem seu propósito que somente ele sabe. Nele confio e entrego todos os meus dias para seja feita sua vontade.

A Nossa Senhora, Maria, que não desamparais nem desprezais os seus, que nos toma debaixo de vosso poderoso amparo nos maiores desafios da vida e da morte.

Aos órgãos de fomento da pesquisa, CNPQ e CAPES pelo apoio financeiro aos projetos e bolsas de estudo, através dos quais essa pesquisa teve como base para sua realização.

Ao Centro Especializado em Micologia Médica e à Universidade Federal do Ceará pela estrutura que proporcionou a execução desse trabalho.

Aos professores e toda equipe vinculada ao Centro Especializado em Micologia Médica pelas contribuições diretas e indiretas para realização do estudo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica por todos os ensinamento e pela formação que hoje busco manter constante, reconhecendo tudo que ainda não sei, mas sempre com o desejo de buscar as respostas.

A professora Dr. Sâmia Brilhante. Cheguei a sua porta, vindo de uma cidadezinha do interior, um completo desconhecido e tive o tão sonhado “aceito”. Nesses curtos cinco anos de jornada eu tive a honra e o privilégio de lhe ter sido seu aluno de mestrado e doutorado. A senhora foi ao pé da letra uma verdadeira professora e orientadora, me ensinou tudo o que eu precisava saber, me mostrou os melhores caminhos a seguir. E como orientadora a senhora sempre foi uma verdadeira leoa, sempre enfrentando as dificuldades ao meu lado, me ensinando a crescer com meus erros. E a cada crescimento a senhora me apertava e acreditava mais que eu poderia ir ainda mais longe e isso me tornou o profissional que sou hoje. A senhora mudou a minha vida, abriu portas até então apenas sonhadas. Essa jornada chega ao seu fim, mas seus ensinamentos irão seguir comigo para sempre. Obrigado por todo carinho que me deu nesses anos.

A ex-secretária do PPGMM, Carol, agora aposentada, que durante os anos que esteve na secretaria fez o possível e impossível para ajudar a todos os alunos nessa jornada de pós-graduação. Obrigado por ter sido o suporte técnico e muitas vezes até psicológico dos alunos.

A Terezinha de Jesus Rodrigues (Tetê), minha amada técnica de laboratório, dona de um abraço que cabe a todos e um coração sempre aberto para receber mais um filho postiço.

Tetê, você é a alma e o coração do CEMM, mantendo o funcionamento deste lugar por tanto anos de uma forma tão leve e tão amável.

Aos colegas e amigos que trabalharam diretamente comigo nestes anos de doutorado e que contribuíram significativamente para o desenvolvimento desse trabalho, Mirele e Feynman. Cada um contribuiu para que eu chegasse até esse momento, de uma forma ou de outra. A jornada é sempre melhor quando é feita em grupo.

Ao Anderson Costa, por todo companheirismo, ajuda, pelos ensinamentos e sonhos compartilhados dentro e fora do laboratório. Você tem me inspirado a ser um ser humano cada vez melhor.

Aos grandes amigos que fiz durante esse período que passei no CEMM e que espero sempre ter na minha vida. Rosana Serpa, não há um dia que se passe sem eu me lembrar de você e de nosso convívio. Sou grato todos os dias por ter te conhecido, seus ensinamentos me acompanharam e sempre me acompanharão nas minhas jornadas. Germana Paixão, quem diria que uma pessoa que conheci em tão pouco tempo, teria tanto, mais tanto a me ensinar? Parece que você chegou na minha vida no momento certo e só me trouxe bons conselhos, sou só gratidão por tudo que fez e faz por mim e pelo privilégio da sua amizade. Jonathas Sales (Jow), não sei como te agradecer nem o que te dizer, você foi mais que um amigo, foi um irmão, que me acolheu mesmo antes que eu entrasse nessa vida acadêmica, você esteve comigo literalmente do início ao fim dessa jornada e espero que esteja em todas as próximas que virão. Um dia recompensarei tudo o que fez e faz por mim.

Aos colegas da UFC que se tornaram amigos da vida, Ana Luiza, Expedito, Matheus, Bruno, Nicole, Gessica, Xhaulla, Renan, Tony e tantos outros que tenho o privilégio de ter no meu ciclo de amigos. É sempre bom estar na companhia de vocês.

Aos amigos que estão fora desde meio, mas são responsáveis por me manter sempre de pé, e com os quais sempre dou ótimas risadas e vivo incríveis momentos e que fazem da jornada da vida seja infinita enquanto durar. Em especial a Cirlaedna Pereira, um ser de luz, que não me deixou sozinho em nenhum momento da minha jornada, sempre presente, sempre sorrindo e me fazendo sorrir, sempre abraçando e me cuidando, nos melhores momentos e no pior dos momentos, a quem nunca hesitou abrir mão do seu tempo e compromissos, para correr e me estender a mão. O meu coração é pura gratidão, o que você fez e faz por mim não tem preço.

Aos meus pais, Ana Cleide e Valdemar, por todo apoio e dedicação prestados para possibilitar a realização de cada sonho almejado, estando sempre ao meu lado em todas as minhas decisões e respeitando cada uma delas. Obrigado por serem os pais que qualquer filho

sonharia em ter. Nada disso seria possível sem vocês ao meu lado, espero um dia ser ao menos uma parcela do filho que vocês merecem ter. Essa conquista é minha tanto quanto de vocês.

Ao meu irmão Carlos Vinicius, que sempre está a se importar e cuidar de mim, que cuida de nossa família com tanto zelo assumindo o seu e o meu papel de filho para que eu possa estar aqui hoje.

Ao meu irmão Venâncio Pereira, que Deus levou desde mundo para um lugar melhor, mas que durante seus 18 anos de vida, me permitiu ser seu irmão, me mostrou a beleza da vida em cada abraço apertado quando eu voltava para casa, seus abraços sempre foram a fonte de renovação das minhas forças. Você sempre esteve comigo em todas as minhas conquistas e sempre vibrou mais que eu em cada uma. Hoje é difícil saber que você não está aqui para me abraçar e vibrar junto comigo, mas eu sei que aí de cima você me olha e vibra com os anjos por mais essa conquista. Eu sempre estarei aqui por você, orando e rezando, assim como sei que você sempre estará aí em cima por mim, me protegendo. A ti dedico essa conquista meu irmão e por sua memória, continuarei aqui, seguindo em frente, crescendo cada vez mais, como você sempre desejou.

Finalmente, a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte dessa conquista e que porventura não tenham sido citados anteriormente.



“Não tenho medo do caminho, tenho medo de não  
caminhar.”

Augusto Cury

## RESUMO

A esporotricose, infecção fúngica causada por fungos dimórficos pertencentes ao gênero *Sporothrix*, é a micose subcutânea mais prevalente no mundo. Além do limitado arsenal farmacológico para o tratamento desta doença, estudos recentes mostraram que *Sporothrix* spp. é capaz de formar biofilmes, estrutura classicamente associada com aumento de tolerância a antifúngicos. Dessa forma, terpinen-4-ol e moléculas de *quorum sensing* (MQSs) descritas anteriormente com atividade antifúngica passam a ser interessantes moléculas de estudo contra biofilmes de *Sporothrix* spp. Assim, este estudo objetivou avaliar os efeitos de terpinen-4-ol e das moléculas de *quorum sensing* farnesol, tirosol, 2-feniletanol e triptofol, sobre células planctônicas e formação, sensibilidade e morfologia de biofilmes de *Sporothrix* spp., além de desenvolver um *software* para quantificação de biofilmes fúngicos utilizando *Sporothrix* spp. como modelo de análise. Foram utilizadas neste estudo, 15 cepas de *Sporothrix* spp. nas suas formas filamentosa e leveduriforme. A atividade antifúngica em células planctônicas foi avaliada por meio de ensaio de microdiluição em caldo seguindo os protocolos M27-Ed4 e M38-Ed3 do *Clinical & Laboratory Standards Institute*. Ainda, avaliamos o efeito terpinen-4-ol sobre o teor de ergosterol celular e sua interação com os antifúngicos anfotericina B, itraconazol e terbinafina por meio da técnica de *checkerboard*. O efeito das cinco moléculas sobre a formação de biofilme e/ou biofilme maduro foi avaliado por quantificação de biomassa e atividade metabólica utilizando a técnica de coloração por cristal violeta e ensaio de redução de XTT, além de técnicas de microscopia confocal e eletrônica de varredura para análise da morfologia dos biofilmes. O desenvolvimento do *plugin* foi realizada em linguagem Java para análise da intensidade de fluorescência dos marcadores Syto9 e iodeto de propídio. O terpinen-4-ol apresentou concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando de 4 a 32 µg/ml, diminuindo o conteúdo de ergosterol celular em até 73%. No ensaio de interação farmacológica, o terpinen-4-ol apresentou sinergismo com itraconazol e terbinafina. As MQSs mostraram CIMs na faixa de 0,01-1 µM (farnesol), 1-8 mM (2-feniletanol e tirosol) e > 16 mM (triptofol). Nos ensaios de formação de biofilme, apenas farnesol, tirosol e 2-feniletanol causaram alterações na formação de biofilme. A formação de biofilme filamentoso foi inibida por farnesol (0,016 µM) e 2-feniletanol (0,125 mM) e estimulada pelo tirosol (1 mM), enquanto a formação de biofilme da forma leveduriforme foi inibida por 2-feniletanol (0,125 mM) e tirosol (0,125 mM). Na etapa de avaliação da sensibilidade dos biofilmes maduros o terpinen-4-ol apresentou concentração inibitória mínima em biofilme (CIMB) variando de 64 a 1024 µg/ml, enquanto as MQSs apresentaram CIMB variando de 8-32 µM (farnesol), 8-32 mM (2-feniletanol) e 64-128 mM

(tirosol). Os testes de performance do plugin QuantityFilm mostraram que o método analítico gera resultados comparáveis aos de ensaio de redução de XTT. Dessa forma conclui-se que terpinen-4-ol, farnesol, 2-feniletanol e tirosol possuem atividade antifúngica contra células planctônicas e sésseis de *Sporothrix* spp.; terpinen-4-ol reduz o teor de ergosterol em células de *Sporothrix* spp. e apresenta sinergismo com antifúngicos clássicos; e que as MQSs exógenas modulam a formação de biofilme das formas filamentosas e leveduras de *Sporothrix* spp.

**Palavras-chave:** Percepção de Quorum. Biofilmes. Software. *Sporothrix*.

## ABSTRACT

Sporotrichosis, a fungal infection caused by dimorphic fungi belonging to the genus *Sporothrix*, is the most prevalent subcutaneous mycosis in the world. In addition to the limited pharmacological arsenal for the treatment of this disease, recent studies have shown that *Sporothrix* spp. it is capable of forming biofilms, a structure classically associated with increased tolerance to antifungals. Thus, terpinen-4-ol and *quorum sensing* molecules (MQSs) previously described with antifungal activity become interesting study molecules against biofilms from *Sporothrix* spp. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of terpinen-4-ol and *quorum sensing* farnesol, tyrosol, 2-phenylethanol and tryptophan molecules, on planktonic cells and biofilm formation, sensitivity and morphology of *Sporothrix* spp., in addition to developing software for quantification of fungal biofilms using *Sporothrix* spp. as an analysis model. In this study, 15 strains of *Sporothrix* spp. in its filamentous and yeast forms. Antifungal activity in planktonic cells was evaluated by means of a broth microdilution assay following the protocols M27-A3 and M38-Ed3 of the Clinical & Laboratory Standards Institute. In addition, we evaluated the terpinen-4-ol effect on the cell ergosterol content and its interaction with the antifungal amphotericin B, itraconazole and terbinafine using the checkerboard technique. The effect of these molecules on the formation of biofilm and / or mature biofilm was evaluated by biomass quantification and metabolic activity using the technique of violet crystal staining and XTT reduction assay, in addition to confocal and scanning electron microscopy techniques for analysis of the biofilm morphology. The development of the plugin was performed in Java language to analyze the fluorescence intensity of the Syto9 and propidium iodide markers. Terpinen-4-ol showed minimal inhibitory concentrations (MIC) ranging from 4 to 32  $\mu\text{g/ml}$ , decreasing the cell ergosterol content by up to 72%. In the pharmacological interaction assay, terpinen-4-ol showed synergism with itraconazole and terbinafine. The MQSs showed CIMs in the range of 0.01-1  $\mu\text{M}$  (farnesol), 1-8 mM (2-phenylethanol and tyrosol) and  $> 16$  mM (tryptophan). In the biofilm formation tests, only farnesol, tyrosol and 2-phenylethanol caused changes in the biofilm formation. The formation of filamentous biofilm was inhibited by farnesol (0.016  $\mu\text{M}$ ) and 2-phenylethanol (0.125 mM) and stimulated by tyrosol (1 mM), while the formation of biofilm in the yeast form was inhibited by 2-phenylethanol (0.125 mM) and tyrosol (0.125 mM). In the stage of evaluation of the sensitivity of mature biofilms, terpinen-4-ol presented a minimum inhibitory concentration in biofilm (CIMB) ranging from 64 to 1024  $\mu\text{g/ml}$ , while the MQSs presented CIMB ranging from 8-32  $\mu\text{M}$  (farnesol), 8- 32 mM (2-phenylethanol) and 64-128 mM (tyrosol). The performance

tests of the QuantityFilm plugin showed that the analytical method generates results comparable to the XTT reduction test. Thus, it is concluded that terpinen-4-ol, farnesol, 2-phenylethanol and tyrosol have antifungal activity against planktonic and sessile cells of *Sporothrix* spp.; terpinen-4-ol reduces the ergosterol content in cells of *Sporothrix* spp. and presents synergism with classic antifungals; and that the exogenous MQSs modulate the biofilm formation of the filamentous forms and yeasts of *Sporothrix* spp.

**Keywords:** *Quorum Sensing*. Biofilms. Software. *Sporothrix*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Rotas de transmissão da esporotricose.....	22
<b>Figura 2</b> – Dimorfismo térmico de <i>Sporothrix</i> spp.....	24
<b>Figura 3</b> - Biofilmes de <i>Sporothrix</i> na forma filamentosa e leveduriforme.....	28
<b>Figura 4</b> - Distribuição das espécies de <i>Sporothrix</i> spp. no mundo.....	30
<b>Figura 5</b> - Expansão da esporotricose humana e felina nos últimos anos.....	32
<b>Figura 6</b> - Lesões presentes na esporotricose cutânea localizada.....	33
<b>Figura 7</b> - Lesões presentes na esporotricose linfocutânea.....	34
<b>Figura 8</b> - Molécula de terpinen-4-ol, farnesol, 2-feniletanol, tirosol e triptofol.....	40
<b>Figura 9</b> - Fluxograma de execução do trabalho.....	50
<b>Figura 10</b> - Quantificação do conteúdo de ergosterol celular de <i>Sporothrix</i> spp. após exposição a diferentes concentrações de terpinen-4-ol.....	63
<b>Figura 11</b> - Efeito de terpinen-4-ol em biofilmes da forma filamentosa e leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp.....	64
<b>Figura 12</b> - Micrografias de biofilmes de <i>Sporothrix</i> expostos ao terpinen-4-ol....	65
<b>Figura 13</b> Efeito de moléculas de <i>quorum sensing</i> na filamentação de <i>Sporothrix</i> spp.....	73
<b>Figura 14</b> - Efeito de moléculas de <i>quorum sensing</i> na formação de biofilme de <i>Sporothrix</i> spp. na forma filamentosa.....	75
<b>Figura 15</b> - Efeito de moléculas de <i>quorum sensing</i> na formação de biofilme de <i>Sporothrix</i> spp. na forma leveduriforme.....	76
<b>Figura 16</b> - Micrografias de biofilmes de <i>Sporothrix</i> sp., na forma filamentosa, formados na presença de moléculas de <i>quorum sensing</i> .....	78
<b>Figura 17</b> - Micrografias de biofilmes de <i>Sporothrix</i> sp., na forma leveduriforme, formados na presença de moléculas de <i>quorum sensing</i> .....	79
<b>Figura 18</b> - Esquema de funcionamento do plugin <i>QuantyFilm</i> .....	82
<b>Figura 19</b> - Análise de viabilidade celular e atividade metabólica de biofilmes de <i>Sporothrix brasiliensis</i> .....	83
<b>Figura 20</b> - Análise de correlação entre intensidade de fluorescência de Syto9 obtida pelo método <i>QuantyFilm</i> e absorbância mensurada no ensaio de redução de XTT.....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Origem e local de isolamento das cepas de <i>Sporothrix</i> spp. utilizadas neste estudo.....	48
<b>Tabela 2</b> – Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de antifúngicos e terpinen-4-ol em células planctônicas da forma leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp.....	62
<b>Tabela 3</b> – Concentração inibitória mínima e índice de concentração inibitória fracionada para a combinação de terpinen-4-ol com anfotericina B, itraconazol e terbinafina, frente células planctônicas de <i>Sporothrix</i> spp., na forma filamentosa.....	67
<b>Tabela 4</b> – Concentração inibitória mínima e índice de concentração inibitória fracionada para a combinação de terpinen-4-ol com anfotericina B, itraconazol e terbinafina, frente células planctônicas de <i>Sporothrix</i> spp., na forma leveduriforme.....	68
<b>Tabela 5</b> – Concentração inibitória mínima em biofilme e índice de concentração inibitória fracionada para a combinação de terpinen-4-ol com anfotericina B, itraconazol e terbinafina, frente biofilmes de <i>Sporothrix</i> spp., na forma filamentosa.....	69
<b>Tabela 6</b> – Concentração inibitória mínima em biofilme e índice de concentração inibitória fracionada para a combinação de terpinen-4-ol com anfotericina B, itraconazol e terbinafina, frente biofilmes de <i>Sporothrix</i> spp., na forma leveduriforme.....	70
<b>Tabela 7</b> – Concentração inibitória mínima de moléculas de <i>quorum sensing</i> exógenas em células planctônicas de <i>Sporothrix</i> spp., nas formas filamentosa e leveduriforme.....	71
<b>Tabela 8</b> – Concentração inibitória mínima em biofilme de moléculas de <i>quorum sensing</i> exógenas frente biofilmes de <i>Sporothrix</i> spp., nas formas filamentosa e leveduriforme.....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
ASCII	<i>American Standard Code for Information Interchange</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CFM	Concentração fungicida mínima
CIF	Concentração inibitória fracionada
CIM	Concentração inibitória mínima
CIMB	Concentração inibitória mínima em biofilme
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DICOM	<i>Digital Imaging and Communications in Medicine</i>
DRK1	<i>Dimorphism-regulating kinase 1</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
E-test	<i>Epsilometer Strip Test</i>
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing</i>
FAR	Farnesol
FF	Forma filamentosa
FL	Forma leveduriforme
GQ	Grupo Química
GIF	<i>Graphics Interchange Format</i>
HE	Hematoxilina-eosina
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
ITC	Itraconazol
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
JPEG	<i>Joint Photographic Experts Group</i>
kDa	Quilodalton
KOH	Hidróxido de potássio



kV	Kilovolt
LSM	<i>Local Session Manager</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i>
MEC	Matriz extracelular polimérica
MG	Média geométrica
MOPS	Ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico
MQSs	Moléculas de <i>Quorum Sensing</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
nm	Nanômetro
NIMH	National Institute of Mental Health
PAS	Ácido periódico Schiff
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLECT	Paracoccidioidomicose, leishmaniose, esporotricose, cromoblastomicose e tuberculose
PNG	<i>Portable Network Graphics</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>s. l.</i>	<i>Sensu lato</i>
<i>s. str.</i>	<i>Sensu stricto</i>
SNC	Sistema nervoso central
TIFF	<i>Tagged Image File Format</i>
T-OH	Terpinen-4-ol
TRB	Terbinafina
TIR	Tirosol
TRP	Triptofol
ufc	Unidade formadora de colônia
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[carbonilofenilamino]-2-tetrazóliohidróxido

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1.</b>	<b>Esporotricose</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1.1.</b>	<i>Aspectos históricos</i> .....	<b>22</b>
<b>2.1.2.</b>	<i>Agente etiológico</i> .....	<b>24</b>
<b>2.1.2.1.</b>	<i>Aspectos ecológicos</i> .....	<b>24</b>
<b>2.1.2.2.</b>	<i>Aspectos morfológicos</i> .....	<b>26</b>
<b>2.1.2.3.</b>	<i>Fatores de virulência de Sporothrix</i> .....	<b>27</b>
<b>2.1.2.3.1.</b>	Biofilmes.....	<b>29</b>
<b>2.1.3.</b>	<i>Epidemiologia</i> .....	<b>32</b>
<b>2.1.3.1.</b>	<i>Global</i> .....	<b>32</b>
<b>2.1.3.2.</b>	<i>No Brasil</i> .....	<b>34</b>
<b>2.1.4.</b>	<i>Manifestações clínicas</i> .....	<b>36</b>
<b>2.1.4.1.</b>	<i>Forma cutânea localizada</i> .....	<b>36</b>
<b>2.1.4.2.</b>	<i>Forma linfocutânea</i> .....	<b>37</b>
<b>2.1.4.3.</b>	<i>Forma cutânea disseminada</i> .....	<b>38</b>
<b>2.1.5.</b>	<i>Diagnóstico laboratorial</i> .....	<b>38</b>
<b>2.1.6.</b>	<i>Tratamento farmacológico</i> .....	<b>40</b>
<b>2.1.6.1.</b>	<i>Iodeto de potássio</i> .....	<b>41</b>
<b>2.1.6.2.</b>	<i>Itraconazol</i> .....	<b>41</b>
<b>2.1.6.3.</b>	<i>Terbinafina</i> .....	<b>42</b>
<b>2.1.6.4.</b>	<i>Anfotericina B</i> .....	<b>42</b>
<b>2.2.</b>	<b>Busca por moléculas com potencial antifúngico</b> .....	<b>43</b>
<b>2.2.1.</b>	<i>Terpinen-4-ol</i> .....	<b>44</b>
<b>2.3.</b>	<b>Métodos de estudo da atividade antifúngica <i>in vitro</i></b> .....	<b>45</b>
<b>2.3.1.</b>	<i>Avaliação da atividade antifúngica em biofilmes</i> .....	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	<b>50</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>
<b>4.1.</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>51</b>
<b>4.2.</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>52</b>
<b>5.1.</b>	<b>Local do estudo</b> .....	<b>52</b>

5.2.	Microrganismos.....	52
5.3.	Desenho experimental.....	53
<b><u>1ª PARTE EXPERIMENTAL</u></b> .....		54
5.4.	Drogas teste.....	54
5.5.	Sensibilidade de células planctônicas leveduriformes .....	54
5.6.	Quantificação do teor de ergosterol celular.....	55
5.7.	Teste de sensibilidade de biofilmes maduros de <i>Sporothrix</i> .....	55
5.7.1.	<i>Ensaio de quantificação de biomassa</i> .....	56
5.7.2.	<i>Ensaio de quantificação de atividade metabólica</i> .....	56
5.7.3.	<i>Microscopia confocal de varredura a laser</i> .....	57
5.7.4.	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i> .....	57
5.8.	Ensaio de combinação de drogas - <i>checkerboard</i> .....	58
5.9.	Análises estatísticas .....	59
<b><u>2ª PARTE EXPERIMENTAL</u></b> .....		59
5.10.	Drogas teste.....	59
5.11.	Sensibilidade de células planctônicas às moléculas de <i>quorum sensing</i> .....	59
5.12.	Efeito de MQSs na filamentação de <i>Sporothrix spp.</i> .....	60
5.13.	Efeito de MQSs nos biofilmes de <i>Sporothrix spp.</i> .....	60
5.13.1.	<i>Análise na etapa de formação</i> .....	60
5.13.2.	<i>Análise no biofilme maduro</i> .....	61
5.14.	Análises estatísticas .....	61
<b><u>3ª PARTE EXPERIMENTAL</u></b> .....		61
5.15.	Aquisição de dados prévios .....	61
5.16.	Desenvolvimento de <i>plugin</i> para análise de biofilme .....	62
5.16.1.	<i>Escolha do software de incorporação</i> .....	62
5.16.2.	<i>Estruturação dos comandos do plugin</i> .....	62
5.16.3.	<i>Análise dos dados gerados</i> .....	65
6	<b>RESULTADOS</b> .....	66
<b><u>1ª PARTE EXPERIMENTAL</u></b> .....		66
6.1.	Efeito de T-OH em células planctônicas leveduriformes .....	66
6.2.	Influência de T-OH no teor de ergosterol celular .....	67
6.3.	Efeito da exposição de biofilmes de <i>Sporothrix</i> ao T-OH .....	68
6.4.	Efeito de T-OH na estrutura e morfologia de biofilmes de <i>Sporothrix</i> .....	70
6.5.	Interação entre T-OH e antifúngicos em células planctônicas .....	72
6.6.	Interação entre T-OH e antifúngicos em biofilmes maduros.....	72

<b><u>2ª PARTE EXPERIMENTAL</u></b> .....	77
6.7. Efeito de MQSs em células planctônicas.....	77
6.8. Efeito de MQSs na filamentação de <i>Sporothrix</i> spp.....	78
6.9. Efeito de MQSs na etapa de formação de biofilme.....	79
6.10. Sensibilidade de biofilmes de <i>Sporothrix</i> spp. às MQSs .....	86
<b><u>3ª PARTE EXPERIMENTAL</u></b> .....	87
6.11. Escolha do <i>software</i> de acoplamento .....	87
6.12. Estrutura de funcionamento .....	87
6.13. Quantificação de viabilidade celular por fluorescência .....	88
7 DISCUSSÃO.....	91
8 CONCLUSÕES .....	99
REFERÊNCIAS .....	100
APÊNDICES .....	130
APÊNDICE A – Artigo publicado com dados da tese ( <i>Future Microbiology</i> – Qualis A2) .....	131
APÊNDICE B – Artigo publicado com dados da tese ( <i>Biofouling</i> – Qualis B1) .....	145
APÊNDICE C – Certificado de Registro de Programa de Computador .....	159
APÊNDICE D - Lista de publicações em periódicos científicos (2018-2021) .....	160

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas (1995-2015) tem-se presenciado o aumento das doenças infecciosas fúngicas, elevando as taxas de mortalidade e morbidade humana (MADOFF; KASPER, 2015). As infecções fúngicas podem manifestar-se de diversas formas. Dentre as infecções fúngicas subcutâneas a mais relatada em todo o mundo é a esporotricose, causada por fungos dimórficos pertencentes ao gênero *Sporothrix* (MAHAJAN, 2014).

A esporotricose vem ganhando importância nos últimos anos devido à alta prevalência nas mais diversas partes do mundo, como Brasil, Argentina, China, Japão, Austrália e partes da África e Europa (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017). As principais espécies envolvidas nessa patologia são *Sporothrix schenckii sensu stricto*, *Sporothrix brasiliensis* e *Sporothrix globosa* (CHAKRABARTI et al., 2015).

Para terem a capacidade de infectar os diversos nichos do hospedeiro, os microrganismos apresentam diversas adaptações biológicas, chamadas de fatores de virulência. Dentre estas adaptações, pode-se citar a formação de biofilmes microbianos (ALSPAUGH, 2015; BRILHANTE et al., 2018a). Um dos fatores que merece destaque no processo de formação de biofilmes é a presença de comunicação celular mediado por sistema *quorum sensing*. Esse sistema está envolvido com a comunicação celular em mediado por moléculas indutoras ou inibidoras de *quorum*, que se acumulam gerando um processo de regulação do biofilme (WONGSUK; PUMEEASAT; LUPLERTLOP, 2016). No tocante a regulação desse sistema de comunicação microbiano, várias moléculas indutoras ou inibidoras de *quorum* já foram relatadas como farnesol, feniletanol, tirosol e triptofol (WONGSUK; PUMEEASAT; LUPLERTLOP, 2016).

Quanto ao tratamento da esporotricose um dos desafios é o limitado arsenal farmacológico disponível para escolha do melhor tratamento. Dentre as opções tem-se solução saturada de iodeto de potássio, itraconazol, terbinafina e anfotericina B, sendo esta última indicada apenas nos casos de infecção disseminada (ALMEIDA-PAES et al., 2017b). Esse arsenal terapêutico limitado, associado ao surgimento dos fenótipos resistentes de *Sporothrix* spp. levando a um número crescente de refratários (BAKER et al., 1989; GOMPERTZ et al., 2016; KIM; KIM; KIM, 1997; SHINOGI; MISAGO; NARISAWA, 2004), impulsiona a busca de moléculas eficazes contra *Sporothrix* spp. (WALLER et al., 2016).

Nessa perspectiva a investigação de moléculas de origem natural como terpinen-4-ol, um monoterpene presente em óleos essenciais, destaca-se por possuir propriedades antifúngicas *in vitro* contra fungos filamentosos, leveduras e dimórficos (BRILHANTE et al., 2016;

HAMMER; CARSON; RILEY, 2004; MORCIA; MALNATI; TERZI, 2012). Além disso, dada a importância dos biofilmes como estruturas de resiliência, as moduladoras de *quorum sensing* também vêm se tornando alvo de investigações por atuarem em processos de desfragmentação dessas estruturas (ZHANG et al., 2019a).

O efeito de drogas antifúngicas sobre biofilmes pode ser avaliada por diversas técnicas como técnicas colorimétricas para quantificação da biomassa e atividade metabólica e técnicas complementares de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser (SIMITSOPOULOU; CHATZIMOSCHOU; ROILIDES, 2016). Atualmente a análise de imagens de biofilmes por microscopia confocal é realizada pela utilização do *plugin* COMSTAT que destina-se a avaliar parâmetros como biomassa e espessura dos biofilmes (HEYDORN et al., 2000b), mas que não possui nenhuma função voltada para análise da viabilidade celular para geração de dados correlatos aos obtidos por metodologias como o ensaio de redução de XTT, amplamente utilizada na micologia para avaliação da sensibilidade de biofilmes a antifúngicos.

Diante do exposto, nos propusemos a avaliar o efeito de terpinen-4-ol sobre células planctônicas e biofilmes de *Sporothrix* spp., bem como sua interação com drogas antifúngicas clássicas, além de investigar o efeito de moléculas moduladoras de *quorum sensing* sobre células planctônicas, formação de biofilmes e biofilmes maduros de *Sporothrix* spp. Ainda por base nas limitações de ferramentas de análise de imagens de microscopia de biofilmes fúngicos, tivemos como objetivo o desenvolvimento de *plugin* para quantificação de viabilidade celular nos biofilmes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Esporotricose

#### 2.1.1. Aspectos históricos

A esporotricose é uma doença fúngica classicamente de acometimento subcutâneo. Geralmente afeta a pele e as mucosas, embora outras formas clínicas raras possam comprometer articulações, ossos, sistema nervoso central e pulmões. A primeira descrição clínica da esporotricose foi relatada em 1898, no *Johns Hopkins Hospital* em Baltimore (EUA), pelo médico americano Benjamin Schenck ao isolar um fungo proveniente de nódulos ulcerados nos dedos e antebraço de um paciente de 36 anos de idade. Na época o médico encaminhou a cultura do microrganismo ao patologista e micologista Erwin Frink Smith, que identificou o fungo como uma espécie pertencente ao gênero *Sporotrichum* (SCHENK, 1898). A publicação desta descoberta é tida como a certidão de nascimento da esporotricose (TÉLLEZ et al., 2014).

Caso semelhante foi descrito por Hektoen e Perkins em 1900, em Chicago (EUA), desta vez em uma criança do sexo masculino, de 5 anos de idade, que apresentou lesões semelhantes as descritas por Benjamin Schenck. Por discordarem da classificação anterior feita por Erwin Smith, os pesquisadores propuseram a criação do gênero *Sporothrix* para o agente etiológico da esporotricose (HEKTOEN; PERKINS, 1900). A proposta de Hektoen e Perkins não vigorou na época e somente em 1962, estes fungos foram reclassificados por Carmichael, por diferenciação morfológica, que determinou que a correta nomenclatura do agente da esporotricose era *Sporothrix schenckii* (RIPPON, 1988).

No Brasil o primeiro caso de esporotricose foi relatado alguns anos após, em 1907, por Lutz e Splendore, não em humanos mas sim em ratos, naturalmente infectados no sistema de esgoto da cidade de São Paulo (LUTZ; SPLENDORE, 1907). Pouco tempo depois, em 1908, Splendore descreveu a detecção de corpos de asteroides em torno de células leveduriformes de *Sporothrix* spp., que se tornaria um achado característico em exames histológicos de pacientes com esporotricose (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011).

Alguns anos após, na década de 1920, Aguiar Pupo descreveu casos de esporotricose humana encaminhados ao Serviço de Pele e Sífilis do Hospital Santa Casa de Misericórdia, em São Paulo (LARSSON et al., 1989). E somente em 1950, teve-se o primeiro relato de caso no Brasil de esporotricose envolvendo a transmissão zoonótica (gato-humano), feita por Floriano de Almeida em São Paulo (ALMEIDA et al., 1955).

Em paralelo, houve o relato do maior surto de esporotricose humana com uma fonte ambiental que ocorreu nas décadas de 20 a 40 em uma mina de ouro na África do Sul, onde mais de 3.000 casos foram documentados em nativos infectados com propágulos de *Sporothrix* (DANGERFIELD; GEAR, 1941; PIJPER; PULLINGER, 1927).

Mais alguns anos se passaram para que a doença fosse relatada em outro estado brasileiro, sendo identificada por Terra e Rabelo em 1992, o primeiro caso de esporotricose no Rio de Janeiro (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011). Deste então o Rio de Janeiro tornou-se uma importante zona de epidemia da esporotricose felina e humana, sendo esta considerada um problema de saúde pública (RODRIGUES et al., 2020).

O conhecimento de que a esporotricose era causada pelo então único agente etiológico *S. schenckii* perdurou por mais de um século (1898–2006). Entretanto, com o advento e refinamento das técnicas de biologia molecular e sua aplicação direta na taxonomia de fungos, demonstrou-se que a esporotricose não era causada apenas por *S. schenckii*, mas sim por mais de uma espécie. O primeiro indício molecular de que o agente clássico *S. schenckii* fosse representado por duas ou mais espécies baseou-se no sequenciamento e análise filogenética da região ITS (do inglês “*internal transcribed spacer*”) localizada no operon ribossomal (rDNA) destes microrganismos (MARIMON et al., 2006).

A análise filogenética combinada baseada na sequência de DNA de três *loci* codificadores de proteínas (quitina sintase,  $\beta$ -tubulina e calmodulina) de diversos isolados de *Sporothrix* provenientes de diversas regiões geográficas, sugeriu que além de *S. schenckii*, três novas espécies (*S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana*) atuavam como agentes etiológicos da esporotricose, sendo então proposta uma divisão do agente *S. schenckii* em um complexo, composto por diferentes espécies patogênicas.

Por um longo tempo, as espécies de *Sporothrix* clinicamente relevantes foram classificados no complexo *S. schenckii*. No entanto, desde 2018, baseando-se na pesquisa básica e clínica do sistema *Sporothrix*-esporotricose, surgiu-se a proposta da dissolução da classificação por complexos (RODRIGUES; FERNANDES; DE CAMARGO, 2018), que são atualmente definidos como um clado monofilético de espécies com relevância clínica equivalente (DE HOOG et al., 2015). Nessa nova proposta que leva em consideração diferenças significativas nas características morfológicas, fisiológicas, genéticas, epidemiológicas, de virulência, além de variação na suscetibilidade a antifúngicos, entre outros aspectos, passaria a se ter o reconhecimento de espécies distintas, em vez de um complexo de espécies (RODRIGUES et al., 2020).



Deste modo, para que não houvesse equívocos sobre a taxonomia do agente causal descrito anteriormente, a descrição das espécies patogênicas passou a ser realizada utilizando o termo em latim *sensu lato* (*s. l.*) para designar o patógeno no seu sentido mais amplo, sem que haja a delimitação molecular de espécie ou a aplicação de extensivos testes fisiológicos e bioquímicos para a caracterização do agente etiológico e a expressão *sensu stricto* (*s. str.*) para designar o agente *S. schenckii* no seu sentido mais restrito (espécie), cuja identificação seja realizada primariamente através do sequenciamento de DNA ou outras técnicas de biologia molecular para a caracterização do fungo (RODRIGUES; FERNANDES; DE CAMARGO, 2018).

### **2.1.2. Agente etiológico**

Atualmente o gênero *Sporothrix* abriga 53 espécies descritas, que se distribuem em dois clados, ambiental e patogênico (RODRIGUES et al., 2020). Os agentes etiológicos da esporotricose são classificadas dentro do Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Ophiostomatales e Família Ophiostomataceae, Gênero *Sporothrix* (MARIMON et al., 2007; ZHANG et al., 2015).

#### **2.1.2.1. Aspectos ecológicos**

Estima-se que as espécies de *Sporothrix* cresçam no solo com uma ampla faixa de temperatura (6,6 a 29 °C) e ampla faixa de umidade relativa (37,5 a 99%) (RAMÍREZ-SOTO et al., 2018). Embora seu melhor crescimento ocorra nas condições climáticas favoráveis, com elevada umidade relativa, acima de 92-100%, e temperatura em torno de 26-30 °C (CARRADA-BRAVO; OLVERA-MACÍAS, 2013).

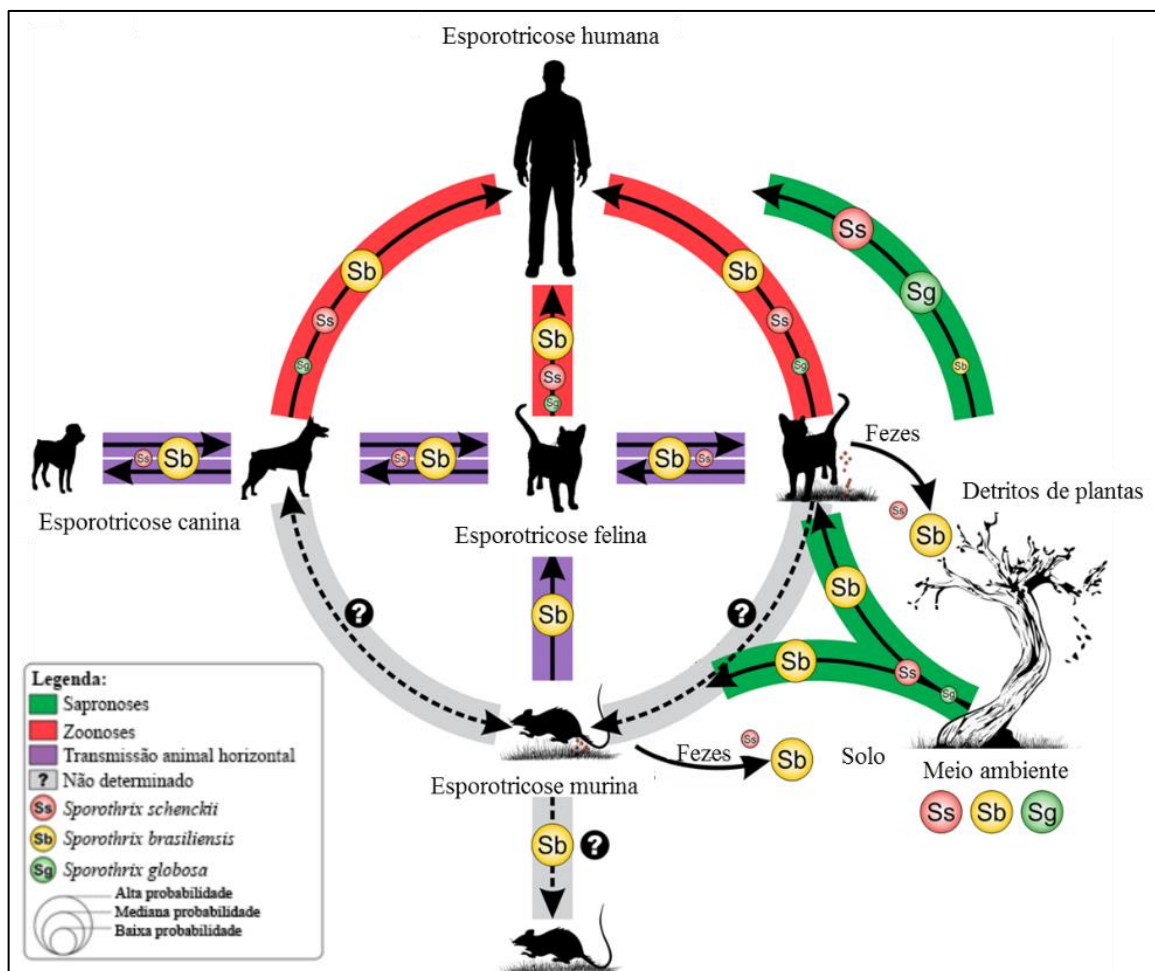
Este fungo existe, normalmente, como sapróbio na natureza e já foi isolado de palha, folha, espinhos de arbusto, madeira, casca de árvore, solo, algas, excretas de animais, aranhas, insetos mortos e larvas (CRUZ, 2013), potencialmente facilitando seu estabelecimento e proliferação no meio ambiente (RAMÍREZ-SOTO et al., 2018).

Por muitos anos a maioria dos casos de esporotricose foram relatados em trabalhadores do sexo masculino jovens e saudáveis, cuja ocupação ou hobby os levavam para locais em que o fungo se fazia presente, tradicionalmente agricultores, jardineiros, paisagistas e laboratoristas, pois estão expostos a materiais contaminados e suas atividades diárias apresentam maior risco de inoculação traumática do fungo (BONIFAZ et al., 2016). Entretanto, na última década o

perfil dessa doença tem sofrido mudanças, havendo um grande aumento no número de transmissões em áreas urbanas, acometendo principalmente mulheres e crianças (CARRADA-BRAVO; OLVERA-MACÍAS, 2013; CRUZ, 2013).

Essa mudança de perfil permitiu que estudos relacionados a transmissão de *Sporothrix* spp., formulassem duas vias de transmissão, a primeira conhecida como via clássica ocorre pela inoculação traumática do fungo, presente na natureza, na camada subcutânea do hospedeiro. A presença dos agentes etiológicos da esporotricose na natureza pode levar a flutuações no número de transmissões (RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2016). A segunda via de transmissão é a zoonótica (via alternativa) que pode ocorrer por mordidas ou arranhões de animais, sendo mais comumente relatados gatos, cães e roedores. A Figura 1 traz uma representação esquemática que resume as formas de transmissão de *Sporothrix* spp. entre animais, meio ambiente e seres humanos.

**Figura 1** – Rotas de transmissão da esporotricose.



A transmissibilidade entre diferentes espécies de interesse clínico é explorada com base em dados epidemiológicos. Fonte: traduzido de Rodrigues; De Hoog; De Camargo (2016).

Os gatos possuem uma posição fundamental na epidemiologia desta doença, além de serem mais susceptíveis imunologicamente a infecção fúngica, seu comportamento natural de afiar as unhas em árvores e cavar o solo para enterrar suas fezes, facilita o abrigo do fungo na região ungueal. Além disso, alguns pesquisadores teorizam que as condições fisiológicas na saliva (pH 7,5 – 8,0), associadas à temperatura corporal felina (intervalo normal 37-39 °C) podem ser um fator de estímulo para a transição micélio-levedura em *Sporothrix* spp. (TRAVASSOS; LLOYD, 1980; ZHANG et al., 2015). Como fator agravante, os gatos infectados ainda apresentam na lesão e nas secreções de feridas ulceradas uma carga exuberante desse microrganismo, potencializando dessa forma a transmissão tanto entre gatos como para o homem (MARQUES-MELO et al., 2014).

#### 2.1.2.2. Aspectos morfológicos

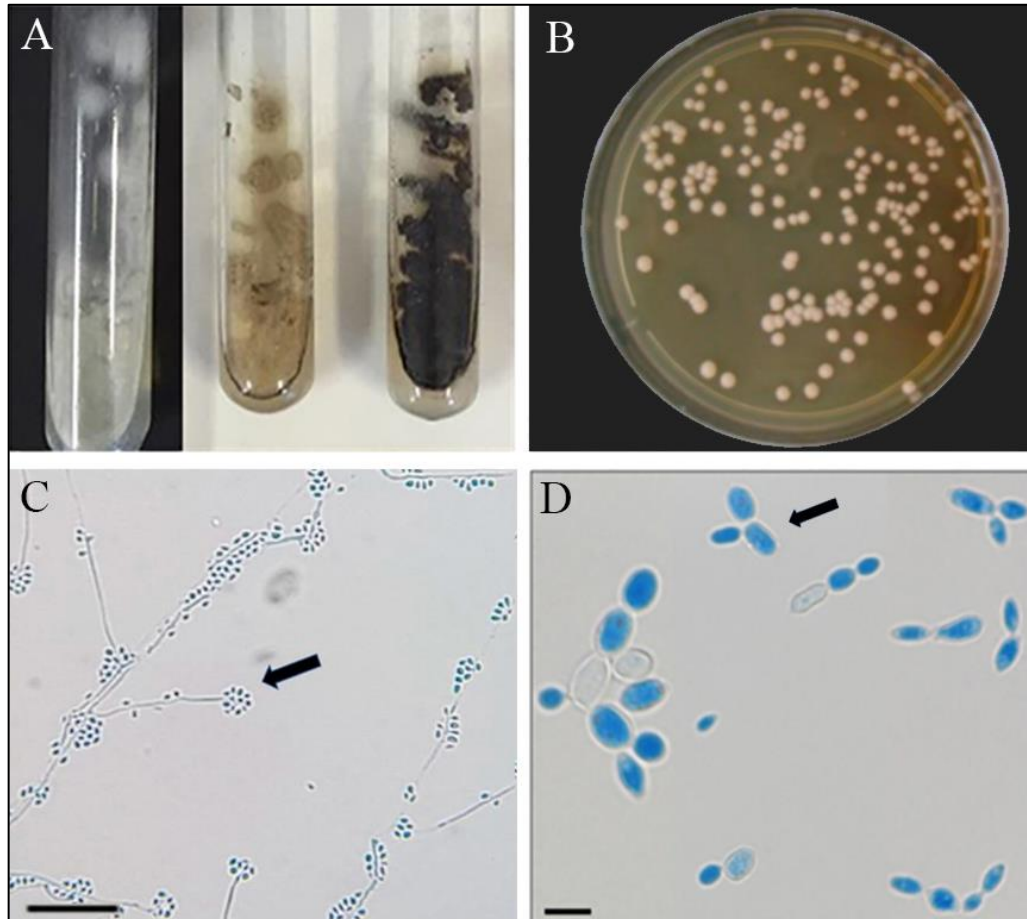
O gênero *Sporothrix* engloba espécies fúngicas classificadas como termodimórficas, ou seja, em seu estágio saprofítico ou em cultivo a temperatura de 25-28 °C se apresenta na forma filamentosa, e causando infecção ou em cultivo a temperaturas em torno de 35-39 °C, na forma leveduriforme (HAN, 2020).

A colônia cultivada à temperatura ambiente de 25-28 °C por 5-7 dias é, a princípio, de branca a creme, com superfície sulcada, podendo permanecer com esta tonalidade ou torna-se castanho-escuras a negras com o passar dos dias (Figura 2A). O mesmo isolado poderá variar sua coloração durante repiques sucessivos, um fenômeno chamado de plasticidade fenotípica (BONIFAZ et al., 2016). Microscopicamente essa forma filamentosa caracteriza-se pela presença de hifas hialinas, septadas, com conídios primários hialinos de 2-3 × 3-6 µm, dispostos simpodialmente lembrando uma flor de margarida (Figura 2C) (BONIFAZ et al., 2016).

À temperatura de 37 °C, *Sporothrix* spp. muda sua morfologia para a forma leveduriforme apresentando, em meios de cultivo, uma colônia de consistência mole, de cor branca a creme e com superfície irregular (Figura 2B). Algumas cepas, necessitam de temperaturas mais baixas para conversão, uma vez que não crescem bem a 37 °C, especialmente aquelas relacionadas à espécie *S. globosa* (MARIMON et al., 2007). Embora sejam necessários meios ricos para a transição do fungo filamentoso para a forma leveduriforme, estas podem ser mantidas a 37 °C em outros meios (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011; MAHMOUDI et al., 2016; TÉLLEZ et al., 2014). Microscopicamente, a forma leveduriforme é caracterizada pela presença de estruturas globosas, ovais ou fusiformes (em forma de charuto)

com dimensões em torno de  $1-3 \mu\text{m} \times 3-10 \mu\text{m}$ , apresentando um ou vários brotamentos (RODRIGUES et al., 2015a) (Figura 2D).

**Figura 2** – Dimorfismo térmico de *Sporothrix* spp.



A: Macroscopia do crescimento de *Sporothrix* spp. na forma filamentosa a 28 °C, em meio ágar batata após 15 dias de crescimento. B: Macroscopia do crescimento de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme a 37 °C, em meio ágar BHI. C: Microscopia de estruturas de *Sporothrix* spp. na forma filamentosa coradas com lactofenol azul de algodão, onde vemos a presença de hifas hialinas e conídios hialinos terminais dispostos simpodialmente, lembrando uma flor de margarida (seta preta) (Barra = 5  $\mu\text{m}$ ). D: Microscopia de estruturas leveduriformes de *Sporothrix* spp. coradas com lactofenol azul de algodão, onde vemos blastoconídios com brotamentos (seta preta) (Barra = 10  $\mu\text{m}$ ). Fonte: Centro Especializado em Micologia Médica.

### 2.1.2.3. Fatores de virulência de *Sporothrix*

Em linhas gerais, a esporotricose humana pode desenvolver-se com diferentes formas clínicas que dependem do resultado da interação parasita-hospedeiro que é influenciada por diversos fatores. No que concerne ao microrganismo podemos citar seus fatores de virulência,

que podem lhe auxiliar no processo de infecção, desde a penetração nos tecidos/órgãos-alvo até a evasão do sistema imunológico (ALSPAUGH, 2015).

Dentro das espécies patogênicas de *Sporothrix* spp., os perfis de virulência variam de acordo com as características do patógeno (FERNANDES et al., 2009; RODRIGUES et al., 2015b). *S. brasiliensis* é a espécie mais virulenta do clado patogênico, capaz de promover intensa invasão tecidual, enquanto *S. schenckii* s. str. apresenta diferentes níveis de patogenicidade, variando de baixa à alta-virulência, e *S. globosa* e *S. mexicana* exibem pouca ou nenhuma virulência em modelos murinos (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009; RODRIGUES et al., 2015b). As espécies *S. mexicana*, *S. chilensis* e *S. pallida* apresentam virulência atenuada em modelo murino, com baixo potencial invasivo, e o hospedeiro pode vir a se recuperar da infecção em algumas semanas (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009; RODRIGUES et al., 2016). Isto reforça que a virulência é uma propriedade emergente, mutável e altamente complexa (FERNANDES et al., 2009).

As informações relacionadas aos fatores de virulência de *Sporothrix* ainda são escassas, mas alguns fatores de virulência podem ser encontrados descritos na literatura, tais como o dimorfismo térmico, produção de melanina, adesinas (MORA-MONTES et al., 2015) e mais recentemente a formação de biofilme (BRILHANTE et al., 2018b).

Uma vez que *Sporothrix* spp. é inoculado no hospedeiro humano tem-se início a uma transição morfológica em resposta à variação da temperatura. Esse processo se inicia após 24 ou 48 h e pode levar até 13 dias (MAHAJAN, 2014). A transição morfológica induzida pela temperatura em *Sporothrix* spp. é uma adaptação morfológica importante para a infecção em animais de sangue quente (SIL; ANDRIANOPOULOS, 2015). A eficiência da conversão micélio-levedura é alta entre as espécies de *S. brasiliensis*, *S. schenckii* s. str., *S. globosa* e *S. luriei*, enquanto que as espécies *S. pallida*, *S. mexicana* e *S. chilensis* variam consideravelmente com relação a essa capacidade e, em geral, apresentam uma transição morfológica deficiente, produzindo poucas leveduras (RODRIGUES et al., 2015b, 2015a). Embora pouco se saiba sobre os fatores que induzem a transição do micélio a levedura, uma histidina quinase híbrida, DRK1, é reconhecidamente um regulador universal do dimorfismo e virulência de fungos dimórficos, incluindo *Sporothrix* spp. (ZHANG; HOU; WU, 2018).

Outro fator que pode auxiliar na proteção do microrganismo é a produção de melanina (ALMEIDA-PAES et al., 2017a). Ambas as formas morfológicas de *Sporothrix* spp. são capazes de sintetizar melanina. A melanização de *Sporothrix* spp. é um importante fator de proteção ambiental contra radiação ultravioleta, por exemplo. A melanização dos conídios confere uma maior resistência a fagocitose pelos macrófagos, o que facilita o desenvolvimento

do processo infeccioso (CHONGKAE et al., 2019). A melanização também tem um papel na patogênese da esporotricose cutânea, uma vez que os isolados melanizados possuem uma capacidade invasiva maior do que os não melanizados, em modelo animal (MADRID et al., 2010). Além disso, a melanização já foi indicada como uma proteção para o microrganismo, *in vitro*, contra drogas antifúngicas, tais como anfotericina B (MARIO et al., 2016) e terbinafina (ALMEIDA-PAES et al., 2016a).

A adesão primária às células epiteliais, bem como aos componentes da matriz extracelular, é essencial para uma invasão efetiva dos tecidos do hospedeiro pelos agentes patogênicos (NATH, 2019). A principal adesina relatada para *Sporothrix* spp. é a 3-carboximuconato ciclase (gp70) que possui peso variando de 60 a 70 kDa, participando da adesão do fungo na derme e na matriz subendotelial do hospedeiro (MORA-MONTES et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015b).

#### 2.1.2.3.1. Biofilmes

O termo “filme”, que se refere à adesão, agregação e multiplicação de microrganismos sobre superfícies, foi utilizado na microbiologia marinha para distinguir aqueles aderidas (sésseis) de outros de nado livre, “planctônicos”, e o termo biofilme foi utilizado pela primeira vez por Zobell e Allen (1935) em um estudo da aderência e crescimento de microrganismos sobre lâminas de vidro submersas em água do mar (HØIBY, 2017; ZOBELL; ALLEN, 1935).

Atualmente os biofilmes são definidos como uma comunidade microbiana aderida a um substrato biótico ou abiótico e submersa em uma matriz extracelular polimérica (MEC) (SAXENA et al., 2019). As células sésseis do biofilme apresentam fenótipo e genótipo diferentes das células planctônicas em relação à transcrição gênica, taxa de crescimento e resistência antifúngica (BERMAN; KRYSAN, 2020). Diversos autores apontam que os microrganismos são encontrados no meio ambiente, predominantemente, na forma de biofilme e não em crescimento livre, forma planctônica (DONLAN, 2002; DOUGLAS, 2003; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; TOURNU; VAN DIJCK, 2012).

A formação de biofilme confere ao(s) microrganismo(s) proteção contra adversidades do ambiente, resistência a estresses físicos e químicos, cooperação metabólica e regulação da expressão gênica baseada na comunidade (RAMAGE et al., 2012; STEWART et al., 2019). A matriz extracelular do biofilme tem papel essencial na defesa dessa comunidade microbiana contra células fagocitárias, dando suporte a integridade do biofilme e agindo como uma barreira que impede a difusão das substâncias tóxicas. Essas características junto com a complexidade

arquitetônica, conferem proteção contra as defesas do hospedeiro (FERNANDES; SILVA; HENRIQUES, 2015; SANDAI et al., 2016).

A formação do biofilme pode ocorrer em superfícies sólidas inanimadas, bem como em tecidos de organismos vivos, tais como dentes e células da epiderme, como um modo de proteção para as células envolvidas sobreviverem a ambientes hostis (KUMAR; MISHRA; SINGH, 2017). Ademais, estima-se que aproximadamente 65% a 80% das infecções microbianas sejam causadas pela formação e persistência de biofilmes no hospedeiro ou em dispositivos médico-hospitalares (NARAYANA; SRIHARI, 2019; SOTO, 2014).

Para que ocorra a formação do biofilme há, inicialmente, a fase de fixação dos microrganismos denominados de colonizadores primários. Zobell (1943) propôs a primeira teoria sobre a fase de adesão, que seria composta por duas etapas. Na primeira etapa ocorre a adesão primária, reversível, e na segunda etapa, a adesão torna-se irreversível. Esta ideia prévia de irreversibilidade se manteve, no entanto, um modelo atual para a formação de biofilme propõe que o processo ocorre, mais detalhadamente, em cinco etapas. Etapa **I.** ocorre o ataque reversível de células planctônicas que se aproximam da superfície por fluido ou por motilidade. Nessa fase, a adesão é mediada por interação hidrofóbica e por forças de Van der Waals, nesse estágio, os microrganismos ainda são facilmente removidos por lavagem da superfície; **II.** há a transição para a forma irreversível de adesão, a qual se dá por meio de interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, ligações iônicas, covalentes e por mecanismos moleculares específicos; **III.** desenvolve-se a estrutura do biofilme, na qual a MEC irá caracterizar a sua arquitetura; **IV.** refere-se ao desenvolvimento e maturação do biofilme. Nessa etapa, MEC continua a ser formada, juntamente, com canais de água e poros. O objetivo desses canais é permitir o fornecimento de nutrientes e gases, de forma igualitária, bem como a remoção de produtos residuais; **V.** acontece a dispersão de células do biofilme para que ocorra a formação de um novo biofilme (MITCHELL; ZARNOWSKI; ANDES, 2016; VILA; ROZENTAL, 2016).

A partir da segunda etapa entra em cena um dos fatores de destaque na formação do biofilme, o sistema *quorum sensing* que medeia a homeostase do biofilme, desde a sua produção de matriz até a maturação e dispersão das células (MONDAL; MAJUMDAR, 2019). Esse sistema está envolvido com a secreção de moléculas sinalizadoras auto-indutoras ou inibidoras que se acumulam gerando sinais de modulação da densidade populacional do biofilme, além de controlarem a expressão gênica das células que o compõem e, portanto, o comportamento microbiano em escala populacional (SAXENA et al., 2019).

A crescente conscientização sobre a importância dos biofilmes fúngicos pode ser confirmada pelo aumento do número de publicações sobre a formação de biofilmes por várias

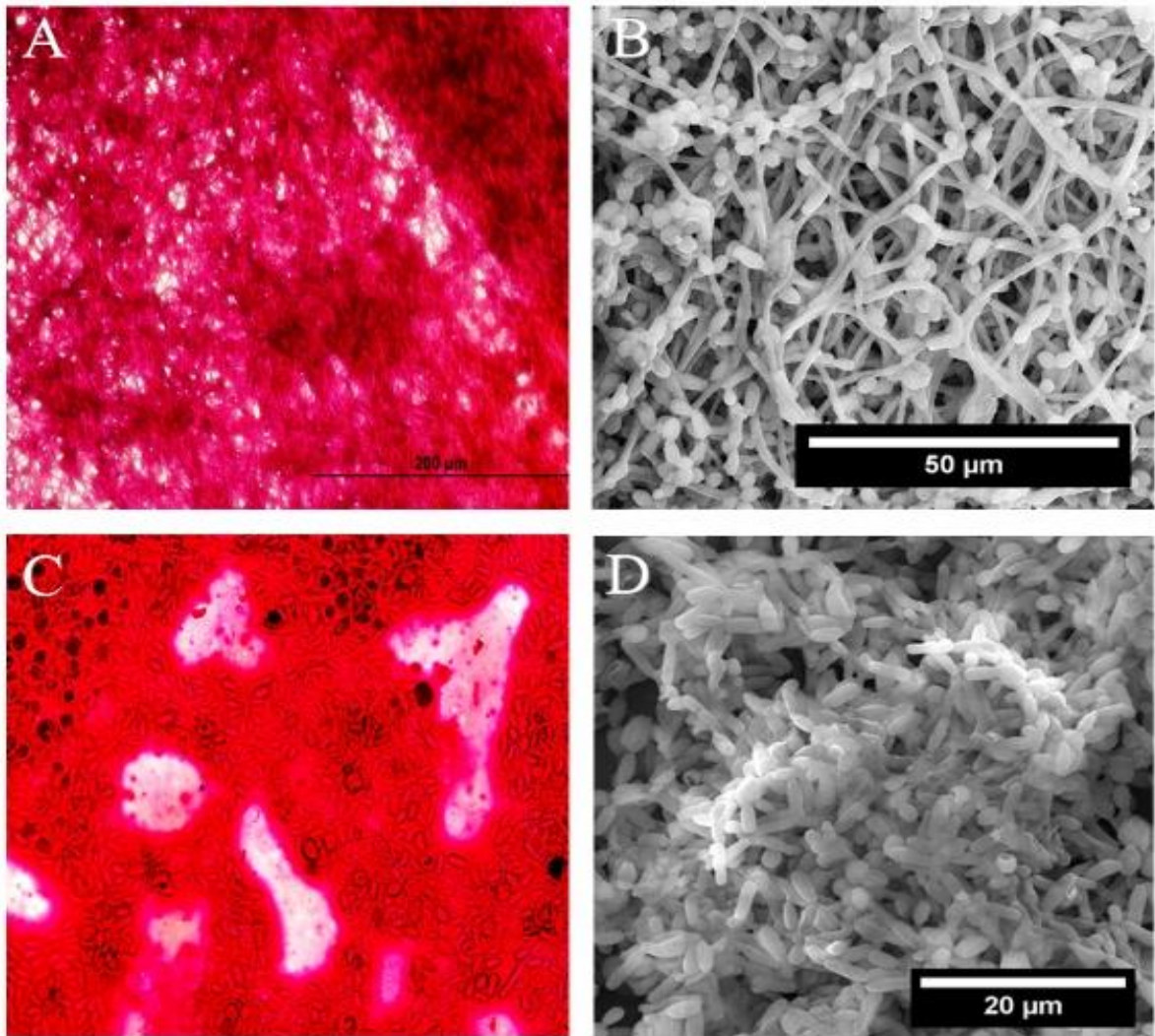
espécies de leveduras de *Candida*, bem como outras leveduras que causam infecções oportunistas em humanos, como *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula* sp., *Trichosporon asahii*, *Blastoschizomyces* e *Cryptococcus neoformans*. Além disso, a capacidade de formar biofilmes também foi demonstrada em vários fungos filamentosos, incluindo *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium* spp. e em fungos dimórficos, como *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Sporothrix* spp. (BRILHANTE et al., 2015a, 2018b; VILA; ROZENTAL, 2016).

O primeiro indício da formação de biofilme de *Sporothrix* sp. foi relatado por Sánchez-Herrera et al. (2014), demonstrando o crescimento do fungo, na forma filamentosa, em “massas celulares”. Estudos posteriores de Brilhante et al. (2018c) demonstram que as espécies *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. globosa*, e *S. schenckii* s. str., na sua forma filamentosa, são fortes formadoras de biofilmes, *in vitro*, constituídos de uma densa camada de hifas entrelaçadas e conídios recobertos por MEC (Figura 3A-3C). Os pesquisadores mostraram ainda, por meio de cinéticas de crescimento, que esses biofilmes levam em média 120 horas para atingir a maturação. O mesmo estudo também relatou diminuição na responsividade do microrganismo às drogas antifúngicas clássicas quando na forma de biofilme, tolerando mais de 50 vezes a concentração dos antifúngicos necessária para eliminação da forma planctônica de *Sporothrix* spp.

Em sequência Brilhante et al. (2019) descrevem pela primeira vez a formação de biofilmes, *in vitro*, pela forma leveduriforme de *Sporothrix* spp. (Figura 3C-3D). O tempo médio para a formação de biofilme nesta morfologia foi de 96 horas de cultivo e a tolerância às drogas antifúngicas foi semelhante ao descrito anteriormente para os biofilmes da forma filamentosa do fungo. Não se sabe ainda se a forma parasitária desse patógeno apresentar-se ou não em biofilme durante o processo infeccioso. Todavia, Mialski et al. (2018) sugeriram a presença de biofilme de *Sporothrix brasiliensis* em um caso de meningite crônica em paciente imunocompetente.



**Figura 3** – Biofilmes de *Sporothrix* na forma filamentosa e leveduriforme.



A e C: Biofilmes de *Sporothrix* spp. na forma filamentosa. C e D: Biofilmes de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme. A e C: Biofilmes corados com vermelho Congo para observação de matriz extracelular. B e D: Biofilmes em microscopia eletrônica de varredura. Fonte: Centro Especializado em Micologia Médica.

### 2.1.3. Epidemiologia

#### 2.1.3.1. Global

A esporotricose possui uma ampla distribuição mundial, ocorrendo predominantemente em áreas de clima quente e temperado (CHAKRABARTI et al., 2015). No entanto, a incidência da doença varia amplamente de país para país, principalmente com base na observação de relatos de casos. Estudos sobre epidemiologia da esporotricose indicam que as regiões endêmicas com maior prevalência anual da doença ocorrem no Brasil (5.814 casos), na China (3.299 casos) e África do Sul (3.154 casos), enquanto que áreas de menor incidência ocorrem

no Japão, Austrália, Índia, América central e parte da América do Sul (ZHANG et al., 2015). Apesar de sua distribuição cosmopolita, existe uma divergência na prevalência e distribuição geográfica dos agentes etiológicos (Figura 4).

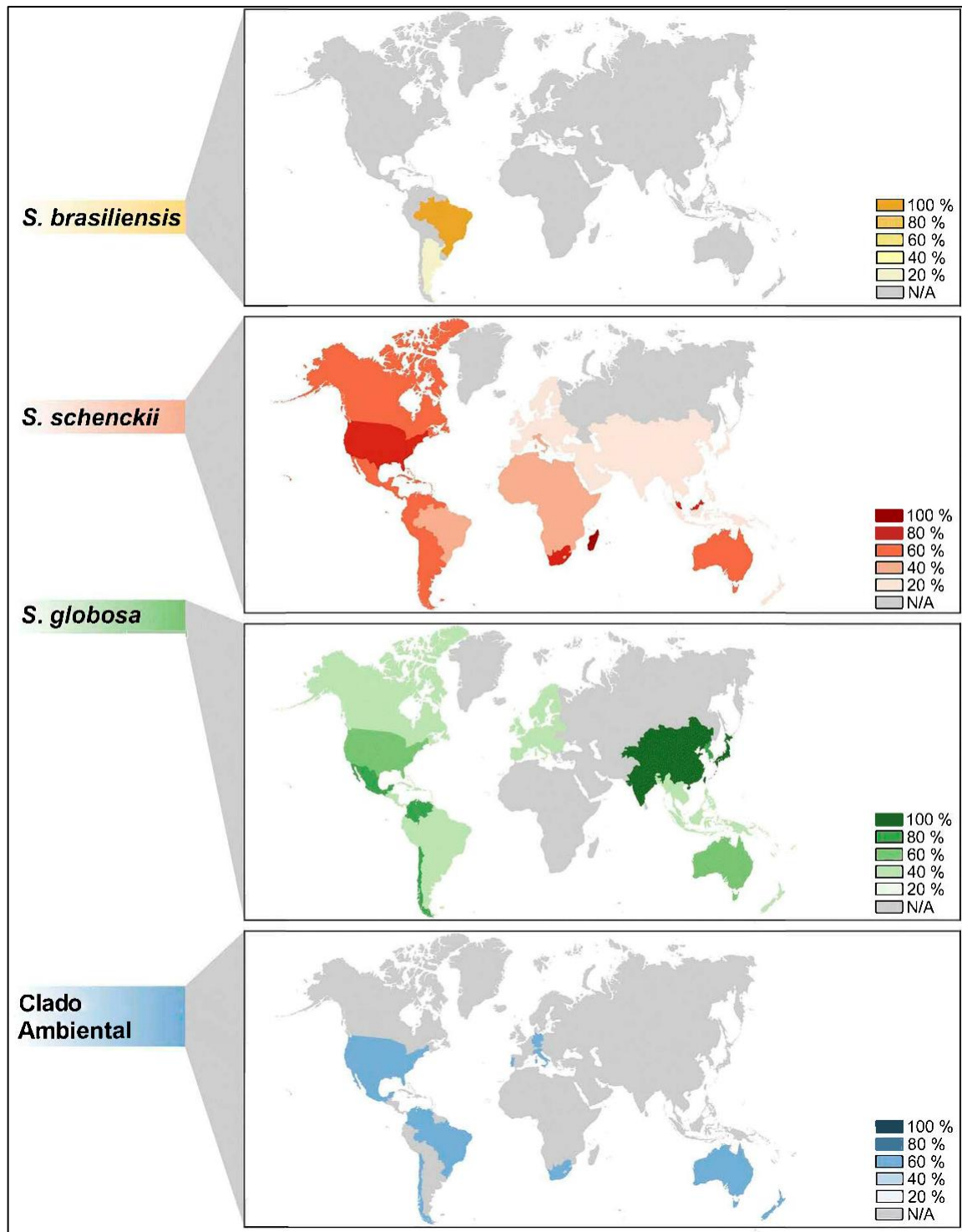
Em quase todas as regiões existe o predomínio de uma espécie em particular. Na Ásia, em especial na China, estima-se que *S. globosa* seja o agente etiológico em 99,3% dos casos de esporotricose humana. Em outras áreas endêmicas, *S. schenckii s. str.* é a espécie mais prevalente como na Austrália e África do Sul (94%), na América do Norte e parte da América do Sul (89%). Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, a espécie *S. brasiliensis* (88%) é o principal agente etiológico da esporotricose humana e animal (BOSCO et al., 2019; CHAKRABARTI, 2020; CHAKRABARTI et al., 2015; ZHANG et al., 2015; ZHOU et al., 2014; ZURABIAN; HERNÁNDEZ, 2019).

Na Europa os casos de esporotricose são atualmente escassos, com casos esporádicos relatados (MONNO et al., 2020). Na Ásia, já foram relatados 78 casos na Índia de 1999 a 2007 (DEVI et al., 2006; HALDAR; SHARMA; GUGNANI, 2007), 27 casos na Malásia entre 2004 e 2010 (CAPOOR et al., 2011; TANG et al., 2012) e 165 casos em Nagasaki entre 1951 e 2012 (TAKENAKA et al., 2014). No nordeste da China, tem havido um aumento no número de casos de esporotricose, tendo-se registro de mais de 400 casos humanos até 2013 (SONG et al., 2013).

Na África, ocorreu entre 1941 e 1944 a maior epidemia de esporotricose já documentada, na qual aproximadamente 3.000 trabalhadores mineiros contaminados por aquisição da doença a partir do contato com vigas de madeira contaminadas que eram utilizadas na sustentação dos túneis das minas (HELM; BERMAN, 1947). Estudos relatam também 2 casos de esporotricose no Sudão (GUMAA, 1978) e 2 casos na Nigéria entre os anos de 1974 e 1979 (GUMAA, 1978). Na África do Sul, foram relatados 154 casos em 1997 (VISMER; HULL, 1997) e 81 casos em 2011 (GOVENDER et al., 2015). Na Oceania, no sudoeste da Austrália, ocorreu um surto tendo novamente o feno como material contaminado entre os anos de 2000 e 2003 (FEENEY et al., 2007).

Nos EUA, esporotricose humana devido a *S. schenckii s. str.* possui um importante aspecto ocupacional, afetando principalmente jardineiros e agricultores. O maior surto ocorreu em 1988, envolvendo 84 pacientes em 15 estados expostos ao fungo presente em musgo, usado para o empacotamento de mudas de árvores sempre verdes (COLES et al., 1992). Estima-se que 1471 hospitalizações associadas à esporotricose ocorreram nos EUA entre 2000 e 2013 (GOLD et al., 2016; OYARCE et al., 2016).

**Figura 4** – Distribuição das espécies de *Sporothrix* spp. no mundo.



Fonte: Traduzido de Rodrigues et al. (2020).

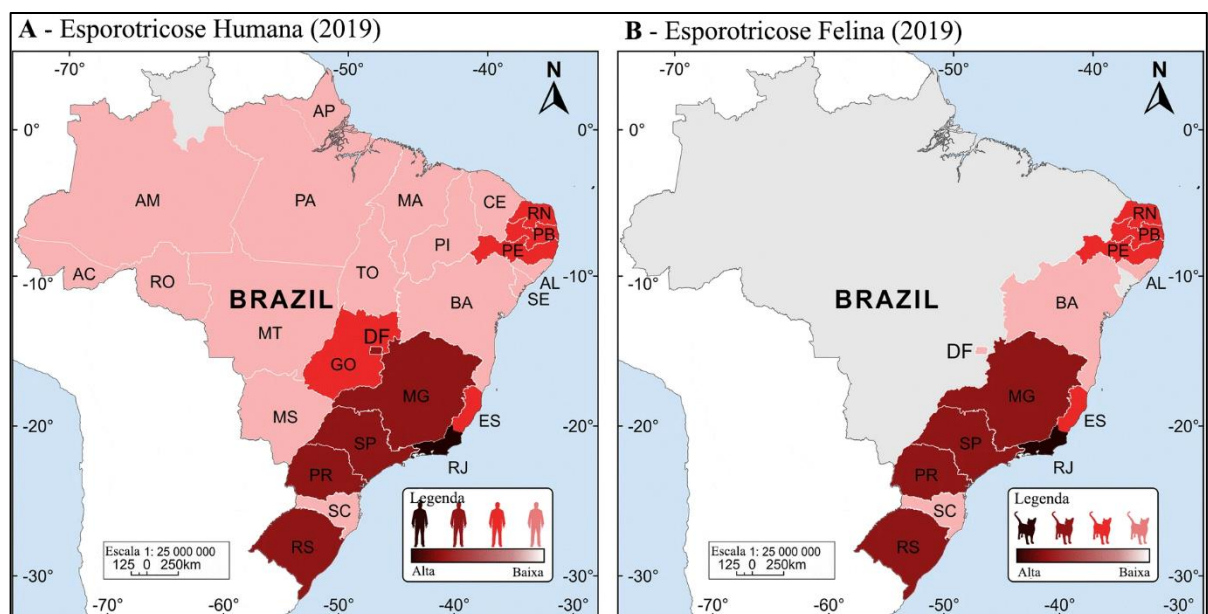
### 2.1.3.2. No Brasil

Nas últimas décadas (1998-2017), um grande surto zoonótico de esporotricose vem ocorrendo no Brasil (GREMIÃO et al., 2017). É difícil estimar a magnitude real da epidemia

uma vez que a esporotricose não era uma doença de notificação compulsória pelos órgãos de saúde pública nacionais até o início de 2020 (BRASIL, 2020). Atualmente a esporotricose humana ocorre em 25 dos 26 estados brasileiros, representando as principais áreas endêmicas e formas clínicas da doença (Figura 5). As regiões Sul e Sudeste do Brasil apresentam uma incidência muito alta de casos humanos, o que está diretamente ligado à grande epidemia de esporotricose transmitida por felino. O genótipo de *S. brasiliensis* infectando gatos é idêntico ao genótipo encontrado em casos humanos na mesma área geográfica, confirmado por métodos moleculares a transmissão zoonótica da doença (GREMIÃO et al., 2017; RODRIGUES et al., 2013).

A perigosa combinação entre diagnóstico e tratamento tardio dos gatos infectados leva a uma rápida transmissão da doença entre os animais e os membros da comunidade. Fatores socioeconômicos como o abandono de animais doentes nas ruas, o descarte inadequado da carcaça de animais mortos que frequentemente são enterrados no próprio quintal ou deixados em terrenos baldios, aliado à ausência de políticas públicas para a contenção da epidemia fez com que as transmissões alcançassem proporções epidêmicas. O aumento no número de casos em felinos é geralmente seguido pelo aumento no número de casos humanos, o que constitui um sério problema de saúde pública (RODRIGUES et al., 2013, 2014a).

**Figura 5** – Expansão da esporotricose humana e felina nos últimos anos.



A: Casos de esporotricose humana relatados em 1998-2019. B: Casos de esporotricose felina relatados em 1998-2019. Fonte: Traduzido de Rodrigues et al. (2020).

Casos esporádicos foram diagnosticados no passado na região nordeste (MARQUES-MELO et al., 2014; NUNES et al., 2013; RAMOS et al., 2017), quase sempre sem a participação de gatos na cadeia de transmissão, envolvendo a transmissão sapronótica clássica. Entretanto nos últimos anos (2015-2019) a esporotricose tem se expandido rapidamente em direção ao nordeste, atingindo principalmente os estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco (RODRIGUES et al., 2020).

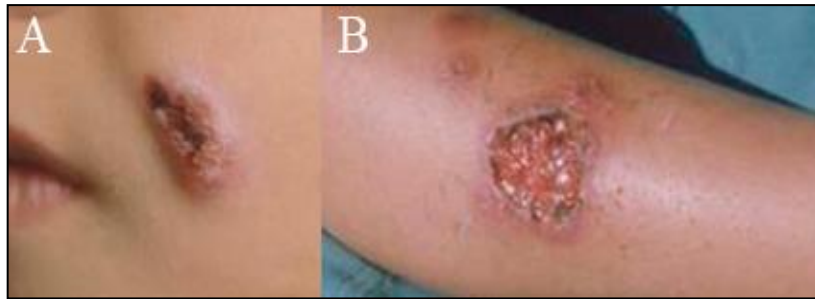
#### **2.1.4. Manifestações clínicas**

A micose subcutânea esporotricose tem como característica a cronificação e tem como manifestações clínicas desde a forma cutânea localizada, com lesão restrita ao local da inoculação, até a forma cutânea disseminada. Em casos mais raros, a esporotricose pode desenvolver-se como uma doença extracutânea grave (OYARCE et al., 2016; VINAY et al., 2020)

##### **2.1.4.1. Forma cutânea localizada**

Em 20% dos casos de esporotricose observa-se a esporotricose localizada, sendo a segunda forma mais comum da doença. Tal manifestação clínica estaria associada a uma sensibilização prévia do indivíduo ao fungo, uma vez que é muito observada em áreas endêmicas, o que proporciona um melhor controle imunológico do hospedeiro, o qual responde ao microrganismo de forma mais eficaz, limitação da lesão ao local da inoculação. Caracteriza-se pela presença de uma única lesão no local de inoculação do fungo (Figura 6A-6B). A lesão única pode ser papulosa ou papulotuberosa, por vezes formando placa verrucosa com ou sem ulceração (TANINRATAPAT; SRISUTTIYAKORN, 2019). Esse tipo de lesão também pode estar presente em outras doenças dermatológicas, especialmente as pertencentes ao grupamento PLECT (Paracoccidioidomicose, Leishmaniose, Esporotricose, Cromoblastomicose e Tuberculose) (BAZZI et al., 2016), sendo, portanto, essencial a confirmação laboratorial do diagnóstico.

**Figura 6** – Lesões presentes na esporotricose cutânea localizada.



Lesões presentes na forma cutânea localizada da esporotricose Fonte: Freitas et al. (2014).

#### 2.1.4.2. *Forma linfocutânea*

A manifestação clínica clássica da esporotricose é a linfocutânea, que é a forma mais encontrada da doença, podem responder por até 75% dos casos de esporotricose registrados (BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017). Essa manifestação clínica da doença tem como característica o desenvolvimento de lesões que, inicialmente, aparecem no local do trauma, constituindo o chamado cancro de inoculação, com posterior desenvolvimento de nódulos indolores ao longo dos vasos linfáticos (Figura 7A), os quais podem amolecer e ulcerar (Figura 7B). As lesões geralmente são úlceras de base infiltrada e eritematosa, podendo ser também pápula, nódulo, placa vegetante e uma lesão úlcero-gomosa. Tal desenvolvimento pode ocorrer estendendo-se do local da lesão em sentido aos vasos linfáticos ou permanecer próximo a essa cadeia de nódulos. Esse arranjo é tão característico que certas doenças como a leishmaniose, cujas lesões podem assumir aspecto semelhante, são denominadas de esporotricóide (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011; SCHECHTMAN; HAY, 2019).

**Figura 7** – Lesões presentes na esporotricose linfocutânea.



Forma linfocutânea da esporotricose com lesões nodulares (A) e ulcerativas (B) com seguimento aos vasos linfáticos. Fonte: Freitas et al. (2014) e Mahajan (2014).

#### 2.1.4.3. *Forma cutânea disseminada*

Quando as células de *Sporothrix* spp. ganham via hematogênica do paciente, disseminando-se para além do local da inoculação os pacientes podem desenvolver a forma cutânea disseminada da doença. Tal manifestação da esporotricose é rara, ocorrendo em menos de 5% dos casos e geralmente está associada a imunodepressão ou doenças crônicas de base, ocorrendo muitas vezes juntamente com a forma extracutânea. Inicialmente, observa-se lesões cutâneas por diversas partes do corpo que, após semanas ou meses podem ulcerar. Alcoolismo, diabetes, corticoterapia prolongada, pacientes HIV-positivos ou com síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) são fatores de risco para a manifestação dessa forma clínica (ALMEIDA-PAES et al., 2015; ALVAREZ-RIVERO et al., 2020; PARKER et al., 2020).

#### 2.1.4.4. *Formas extracutâneas*

A esporotricose extracutâneas é a manifestação clínica da doença mais raramente relatada, sendo observada em menos de 2% dos casos (FREITAS et al., 2014). As lesões são decorrentes da disseminação hematogênica e acredita-se que esse tipo de manifestação se desenvolva após inalação do *Sporothrix* spp., pois em um considerável número de casos não se encontra lesão cutânea primária. Qualquer tipo de tecido ou órgão pode ser acometido, sendo o tecido ósseo, as mucosas e os pulmões os mais acometidos. Os sintomas dessa fase aparecem de acordo com o órgão envolvido, acompanhados de febre e comprometimento geral em alguns casos (AMIRALI et al., 2020; DO MONTE ALVES et al., 2020; LEDERER; SULLIVAN; CRUM-CIANFLONE, 2016).

#### 2.1.5. *Diagnóstico laboratorial*

O diagnóstico da esporotricose se dá levando em consideração uma série de informações como: Suspeita clínica baseada nas manifestações clínicas apresentadas pelo paciente e dados epidemiológicos do doente. Contudo, a apresentação de nódulos, úlceras ou placas verrucosas são comuns a esporotricose e as demais enfermidades do grupamento PLECT e, portanto, exigem um diagnóstico laboratorial diferencial. O padrão ouro de diagnóstico laboratorial da esporotricose é a cultura; porém métodos histopatológicos, sorológicos e moleculares podem ser adotados como ferramentas no processo de diagnóstico (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

De forma geral o diagnóstico micológico utiliza o exame direto com a finalidade de observar estruturas fúngicas diretamente do espécime clínico (HAY et al., 2019). Entretanto, no caso da esporotricose o exame direto não tem grandes aplicações, pois excepcionalmente é positivo. Dessa forma o exame direto negativo não descarta o diagnóstico da esporotricose (CASTREJÓN; ROBLES; ARROYO, 1995; ESTRADA-CASTAÑÓN; ESTRADA-CHÁVEZ; CHÁVEZ-LÓPEZ, 2019; OLIVEIRA et al., 2019)

Por ser uma metodologia de execução simples e barata, além de gerar resultados confiáveis a cultura segue sendo o padrão ouro para o diagnóstico da esporotricose. Os meios de cultura comumente utilizados na rotina laboratorial são o ágar Sabouraud simples, ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol ou ainda o ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida. Espécimes como pus aspirado de nódulos ou biopsias da lesão, quando semeados nesses meios de cultura a temperatura ambiente resultam no aparecimento de colônias filamentosas entre 5 e 15 dias, porém esse período pode se estender por mais dias. Como *Sporothrix* spp. apresentam dimorfismo térmico reversível e tornam-se leveduriformes quando cultivadas entre 35 e 37 °C, a conversão do fungo para sua forma leveduriforme, *in vitro*, pode ser utilizada como estratégia para confirmar o diagnóstico (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

Outra abordagem comum é a realização de exames histopatológicos, que comumente utilizam colorações de hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico Schiff (PAS) ou métodos de impregnação pela prata de Grocott. Entretanto, na maior parte dos casos os achados teciduais não são específicos sendo imprescindível para se estabelecer o diagnóstico diferencial no exame histopatológico (QUINTELLA et al., 2011; WAHAB; DING; YUSOFF, 2020).

As estruturas leveduriforme quando visualizadas medem cerca 3-5 µm e podem ter formato de arredondado ou ovalado, semelhante a um charuto, com único ou múltiplos brotamentos (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017; SIZAR; TALATI, 2019). Entretanto, a visualização de estruturas fúngicas nem sempre ocorre (64,7% dos casos), podendo melhorar depois de examinar vários cortes do histopatológico (CARVALHO et al., 2017; RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017; VINAY et al., 2020).

Nos casos em que o fungo é encontrado, a observação da reação de Splendore-Hoepli dá um forte indício de um caso de esporotricose. O corpo asteroide é formado pela estrutura fúngica basofílica cercada por raios eosinofílicos de complexos antígeno-anticorpos. Esse achado é observado em 20 a 66% dos casos de esporotricose (GEZUELE; DA ROSA, 2005), mas se mostrou ausente em grandes estudos realizados no México (50 casos) e no Brasil (119



casos), onde o corpo asteroide não foi visualizado em nenhum dos casos (ESPINOSA-TEXIS et al., 2001; QUINTELLA et al., 2011).

Testes imunológicos como ELISA também podem ser utilizados no diagnóstico da esporotricose, embora não sejam utilizados frequentemente. O resultado positivo dessas provas é sugestivo, porém não confirma o diagnóstico de esporotricose. Apesar de técnicas sorológicas demonstrarem alta sensibilidade no diagnóstico de esporotricose, algumas situações podem desencadear reações cruzadas em soros de portadores de outras doenças infecciosas como a leishmaniose tegumentar (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017). Ademais, o custo elevado de equipamentos e reagentes se torna fator limitante para utilização desse tipo de diagnóstico na rotina (CRUZ, 2013). Esses exames são úteis principalmente em casos com acometimento extracutâneo, em que o acesso à coleta de amostra para análise micológica se torna difícil como, por exemplo, no envolvimento do SNC e ossos (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017; SIZAR; TALATI, 2019).

Dentro do diagnóstico a área de técnicas moleculares é promissora, porque alia ao mesmo tempo, maior sensibilidade e especificidade em comparação com outros testes descritos (ZHANG et al., 2020). Deve ser destacado, no entanto, que estes testes não estão disponíveis na maioria dos centros de referência pelo elevado custo de material, equipamentos e profissionais qualificados (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017). Diferentes técnicas já foram pesquisadas para melhorar o diagnóstico da esporotricose, dentre elas a PCR convencional, *nested* PCR, PCR *fingerprinting* (OLIVEIRA et al., 2015) e mais recentemente a PCR multiplex com taxa de detecção de até 100% (ZHANG et al., 2019b) e o MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*), que já tem em seus bancos de dados espectros de referência para identificação de espécies de *Sporothrix* spp. (MATOS et al., 2020).

#### **2.1.6. Tratamento farmacológico**

O tratamento da esporotricose é um desafio, o arsenal terapêutico é limitado e a duração do tratamento é longa, o que leva muitas vezes a baixa adesão dos pacientes (CRESTANI et al., 2020). A escolha dos antifúngicos adequados no tratamento baseia-se na condição clínica do paciente, na forma de apresentação clínica das lesões e sua extensão. Alguns fármacos são descritos no tratamento da esporotricose, dentre eles o iodeto de potássio, o itraconazol, a terbinafina e a anfotericina B (LOPES-BEZERRA; MORA-MONTES; BONIFAZ, 2017).

### 2.1.6.1. *Iodeto de potássio*

O iodeto de potássio foi a primeira droga a ser usada no tratamento da esporotricose e apresenta ótimos resultados na melhora efetiva de pacientes frente às formas cutânea fixa e linfocutânea da esporotricose. Em casos de esporotricose cutânea disseminada ou extracutânea não se observa a mesma eficácia, não sendo recomendado seu uso (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011; KHAITAN et al., 2018). O exato mecanismo de ação do iodeto de potássio permanece desconhecido. Alguns estudos sugerem que o iodeto de potássio gera aumento da proteólise agindo sobre os granulomas, enquanto outros autores afirmam que este sal pode promover aumento da fagocitose (COSTA et al., 2013; HAYASHI et al., 2020).

Efeitos adversos frequentemente relatados são: gosto metálico, náusea, vômitos, anorexia, epigastralgia e diarreia. Esses efeitos podem ser atenuados pela redução da dose ou suspensão temporária do fármaco. Com o uso prolongado, alguns pacientes podem apresentar sintomas de iodismo (acentuado gosto metálico e queimação na boca, sialorreia, sensibilidade nos dentes e gengivas e cefaleia) ou toxicidade pelo potássio (arritmias, fraqueza, confusão mental, parestesia em mãos) e não é um medicamento recomendado para uso durante a gestação. Devido aos efeitos adversos relacionados ao iodeto de potássio, este fármaco está caindo em desuso, sendo substituído por fármacos mais efetivos e seguros como o itraconazol (ALMEIDA-PAES et al., 2017c; COSTA et al., 2013; MACEDO et al., 2015).

### 2.1.6.2. *Itraconazol*

Nos últimos anos, o itraconazol foi classificado como fármaco de primeira escolha para o tratamento das formas cutânea e linfocutânea da esporotricose (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011; SIZAR; TALATI, 2019). O itraconazol é um derivado triazólico que age inibindo a enzima 14 $\alpha$ -desmetilase, impedindo assim a desmetilação do precursor Lanosterol em ergosterol, o principal esterol da célula fúngica, o que prejudica a permeabilidade da membrana (BORBA-SANTOS et al., 2016).

As vantagens relacionadas a este fármaco levaram a sua intensa utilização, sendo, atualmente, um dos antifúngicos mais utilizados nas clínicas médicas humana e veterinária. Apesar de ser um fármaco com reduzida toxicidade, alguns efeitos adversos foram descritos, como anorexia, hipocalemia, náuseas, vômitos, hipertensão e cefaleia, e seu uso não é aconselhado para gestantes (KHAITAN et al., 2018; MAHAJAN, 2014). Nos últimos anos tem-se observado relatos de isolados fúngicos resistentes com consequentes falhas terapêuticas e remissão de sintomas das

enfermidades micóticas (ALMEIDA-PAES et al., 2016b; CRESTANI et al., 2020; VETTORATO et al., 2018; WALLER et al., 2020).

#### 2.1.6.3. *Terbinafina*

A terbinafina vem sendo utilizado com sucesso na terapia da esporotricose cutânea, já tendo relatos de uso no tratamento inclusive de esporotricose animal (MAHAJAN, 2014; VIANA et al., 2018). Essa droga é bastante utilizada como alternativa em casos em que o itraconazol não pode ser utilizado, pois apresenta menos interações farmacológicas descritas até o momento. Esta molécula pertence à classe das alilaminas e atua bloqueando a síntese do ergosterol pela inibição da enzima esqualeno epoxidase (GHANNOUM; ISHAM, 2017; MAHAJAN, 2014).

Estudos usando terbinafina em pacientes humanos demonstraram eficácia em doses variando de 250 a 1000 mg/dia. Ainda, essa droga é uma alternativa no tratamento de gestantes com esporotricose. No entanto um fator limitante para a terbinafina, é o seu elevado custo, dificultando o seu uso principalmente em países em desenvolvimento (ANDERSSON; THOMSEN; ANDERSEN, 2020; FRANCESCONI et al., 2011).

#### 2.1.6.4. *Anfotericina B*

Outra droga que também pode ser usada no tratamento da esporotricose é a anfotericina B que é um antibiótico macrolídeo poliênico produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Seu mecanismo de ação mais conhecido ocorre pela interação com o ergosterol da membrana fúngica, formando poros e alterando a permeabilidade da célula fúngica. Esses poros permitem o escape de constituintes citoplasmáticos, causando desequilíbrio eletrolítico e homeostático (GRAY et al., 2012; MACESIC; STONE; WINGARD, 2017). Mecanismos menos conhecidos também decorrem de sua utilização como acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula fúngica e indução da apoptose (BELENKY; CAMACHO; COLLINS, 2013; OLIVEIRA et al., 2020).

Essa droga é utilizada em casos mais graves da esporotricose, como a forma disseminada e extracutâneas (ALMEIDA-PAES et al., 2016b; FREITAS et al., 2012; ISHIDA et al., 2018). Ela também pode ser indicada em pacientes com esporotricose osteoarticular ou que não estão respondendo à terapia com o itraconazol (MAHAJAN, 2014). Seus efeitos adversos incluem

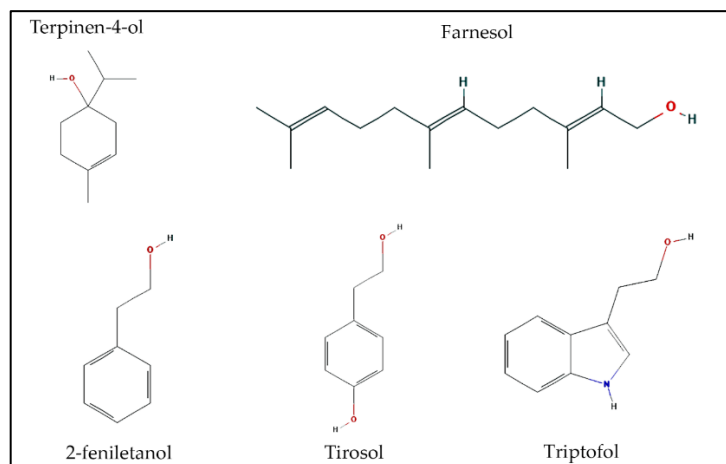
nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, anemia, febre, calafrios, tremores, náuseas e vômitos e dor de cabeça (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

Ainda que as drogas utilizadas no combate a esporotricose geralmente proporcionem terapias antifúngicas eficazes, o arsenal terapêutico disponível é limitado e já foram relatados casos de falhas na terapia antifúngica, infecções refratárias e recaídas dos pacientes (ALMEIDA-PAES et al., 2016b; CRESTANI et al., 2020; PAIXÃO et al., 2015; SHINOGI; MISAGO; NARISAWA, 2004; VETTORATO et al., 2018). Tais situações deixam evidente a necessidade de se encontrar novas moléculas que possam ser empregadas no tratamento da esporotricose.

## 2.2. Busca por moléculas com potencial antifúngico

Diferentes estratégias têm sido utilizadas na prospecção de moléculas com potencial antifúngico. Dentre elas, destacam-se a investigação de produtos naturais ou compostos isolados, que atuem em células planctônicas e biofilmes, tendo em vista que esta é uma organização estrutural diretamente relacionada com a resistência a antimicrobianos (FOREZI et al., 2018; LU et al., 2019; SCORZONI et al., 2016; WALLER et al., 2016). Dentre as moléculas estudadas com essas finalidades tem-se o Terpinen-4-ol (Figura 8), um monoterpreno que se mostra eficaz contra fungos filamentosos, leveduras e dimórficos (BRILHANTE et al., 2016; HAMMER; CARSON; RILEY, 2004; MORCIA; MALNATI; TERZI, 2012) e moléculas de *quorum sensing* que possuem potencial para modular a formação de biofilmes, tais como farnesol, 2-feniletanol, tirosol e triptofol (Figura 8) (MONDAL; MAJUMDAR, 2019; SAXENA et al., 2019).

**Figura 8** – Molécula de terpinen-4-ol, farnesol, 2-feniletanol, tirosol e triptofol.



### 2.2.1. *Terpinen-4-ol*

Muitos compostos isolados de extratos de plantas e óleos essenciais têm demonstrado atividade biológica *in vivo* e *in vitro*. Tais compostos são conhecidos pela sua atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatório, entre outros (WALLER et al., 2016). Quimicamente, estes compostos são na sua maioria pertencentes a classe de terpenos, tal como o terpinen-4-ol (BRILHANTE et al., 2015b).

O terpinen-4-ol (T-OH) é um álcool terpeno monocíclico, presente no óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, que se apresenta como um líquido levemente incolor a amarelo pálido, com sabor de pimenta e cheiro de pinho. Cox, Mann e Markham (2001) comparam a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* com alguns dos seus componentes isolados e demonstraram que o Terpinen-4-ol, o principal componente ativo do óleo, era mais ativo quando utilizado isoladamente.

Este composto apresenta ação antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram negativas; ação antiviral; e ação antiprotozoária contra *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* e *Trichomonas vaginalis* (YADAV; RAO, 2016) e atividade antifúngica contra *Candida* spp., *H. capsulatum* e *C. posadasii* (BRILHANTE et al., 2016; HAMMER; CARSON; RILEY, 2004; MORCIA; MALNATI; TERZI, 2012). Além de atuar em células planctônicas o terpinen-4-ol foi apontado em estudos recentes como uma molécula com potencial antibiofilme (BOSE et al., 2020; FRANCISCONI et al., 2020; MAQUERA HUACHO et al., 2019; TONON et al., 2018).

Em estudos anteriores Brilhante et al. (2015b) investigaram o efeito do terpinen-4-ol sobre o crescimento planctônico da forma filamentosa de espécies de *Sporothrix* spp.. Entretanto, o referido estudo não avaliou os efeitos do terpinen-4-ol sobre o crescimento planctônico da forma leveduriforme de *Sporothrix* spp., nem seus efeitos sobre os biofilmes das formas filamentosa e leveduriforme destes (BRILHANTE et al., 2015b).

### 2.2.2. *Moléculas de quorum sensing*

Recentemente, o sistema de *quorum sensing* se tornou alvo potencial para as terapias antimicrobianas, por estar envolvido no controle da expressão de fatores de virulência. Considerando que a formação e a maturação de biofilmes também são influenciadas por essas moléculas, a modulação desse sistema através da inativação ou da adição de moléculas de

*quorum sensing* pode interferir na dinâmica dos biofilmes, bem como otimizar o processo de desmontagem dessas estruturas (BRACKMAN; COENYE, 2015; MEHMOOD et al., 2019; PALUCH et al., 2020). No tocante aos mecanismos de *quorum sensing* em fungos patogênicos, algumas moléculas já foram descritas, como farnesol, tirosol, 2-feniletanol e triptofol (MEHMOOD et al., 2019).

O farnesol foi inicialmente identificado como uma molécula de *quorum sensing* secretada por *C. albicans*, atuando no bloqueio da transição morfológica da levedura para a hifa, impedindo a formação de biofilme e alterando a expressão gênica de fungos em *C. albicans* (HORNBY et al., 2001; RODRIGUES; ČERNÁKOVÁ, 2020). Além disso, farnesol já mostrou possuir atividade antifúngica contra *Candida albicans* (CORDEIRO et al., 2013), *Cryptococcus* spp. (CORDEIRO et al., 2012), *Trichosporon* spp. (CORDEIRO et al., 2019), *Histoplasma capsulatum* (BRILHANTE et al., 2015a) e *Coccidioides posadasii* (BRILHANTE et al., 2013).

O tirosol é outra molécula de *quorum sensing* que foi relatada em *C. albicans* (CHEN et al., 2004) e desempenha um papel importante na estimulação da formação de tubo germinativo, pseudo-hifa e biofilme de *C. albicans* (SEBAA; BOUCHERIT-OTMANI; COURTOIS, 2019), além de mostrar atividade antifúngica contra espécies de *Candida* (CORDEIRO et al., 2015), *H. capsulatum* e *C. posadasii* (BRILHANTE et al., 2016).

Mais recentemente o 2-feniletanol e triptofol foram descritas como moléculas de *quorum sensing* de *Saccharomyces cerevisiae* (CHEN; FINK, 2006; HOGAN, 2006). 2-feniletanol foi descrito por inibir a filamentação em *C. albicans* (MARTINS et al., 2007) como também a formação de biofilme de *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium* spp. (LIU et al., 2014; PU et al., 2014; WONGSUK; LUPLERTLOP; SUKPHOPETCH, 2020). Já o triptofol foi relatado por regular a germinação de *Aspergillus* sp., a adesão de *Debaryomyces hansenii* e reduzir a filamentação e virulência de *Candida* spp. em modelo *in vivo* (MEHMOOD et al., 2019; SINGKUM et al., 2019).

Destas moléculas, apenas o farnesol foi avaliado contra *Sporothrix* spp., apresentando atividade antifúngica contra a forma filamentosa do fungo. No entanto, o efeito dessa molécula na forma leveduriforme de *Sporothrix* spp. não foi avaliada (BRILHANTE et al., 2015b). Vale ressaltar que nenhuma das quatro moléculas citadas foi avaliada frente aos biofilmes de *Sporothrix* spp., seja na forma filamentosa ou leveduriforme do fungo.

### 2.3. Métodos de estudo da atividade antifúngica *in vitro*

O processo de criação e padronização de métodos de sensibilidade a antifúngicos tem sua história ligada a necessidade do aperfeiçoamento de testes de sensibilidade para auxiliar na escolha mais adequada da terapêutica antifúngica, ao interesse da indústria farmacêutica em utilizar esses métodos para avaliar o desenvolvimento de novas drogas e necessidade de detecção e acompanhamento epidemiológico de casos de resistência antifúngica (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; REX; PFALLER, 2002).

As metodologias empregadas para a análise da atividade de agentes antifúngicos são a de disco-difusão, a de diluição em ágar e as de macro e microdiluição em caldo. A técnica de microdiluição em caldo é tida como padrão-ouro ou técnica de referência para avaliação da sensibilidade a antimicrobianos *in vitro*. Tais teste têm como objetivo final prever a resposta dos pacientes à terapia a ser instituída. Contudo, muitos fatores além do perfil de sensibilidade *in vitro*, influenciam a resposta clínica, como o sítio de infecção, o *status* imunológico do hospedeiro, a farmacocinética da droga e a adesão do paciente à terapia. Portanto, o estabelecimento da correlação clínica direta entre os valores de CIM e o desfecho terapêutico ainda é limitado na terapia antifúngica (JOHNSON; CAVLING-ARENDRUP, 2015).

Bem como para os testes de sensibilidade a antibacterianos, a regra 90-60 também parece ser útil para a avaliação da sensibilidade a antifúngicos, principalmente para os isolados de *Candida* spp., frente aos derivados azólicos. Tal regra preconiza que 90% das infecções causadas por microrganismos que apresentam sensibilidade *in vitro* e 60% das infecções causadas por microrganismos que apresentam resistência *in vitro* respondem bem à terapia antimicrobiana *in vivo*. Dessa forma, a realização de testes de sensibilidade torna-se importante, uma vez que pode orientar a instituição da terapia antifúngica mais adequada, direcionando o paciente aos 90% de sucesso terapêutico (REX; PFALLER, 2002).

As organizações *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) e *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) possuem normas padronizadas para realizar testes de sensibilidade aos antifúngicos, objetivando, promover a concordância entre os laboratórios na determinação da sensibilidade fúngica aos agentes antifúngicos, de forma que os métodos padronizados sejam reproduzíveis, sensíveis e viáveis para uso em laboratórios clínicos de rotina. Diferenças entre as normas disponibilizadas por essas duas organizações têm sido amplamente discutidos em vários relatórios. No entanto seus resultados demonstraram ser comparáveis e são utilizados em todo o mundo (JOHNSON; CAVLING-ARENDRUP, 2015).

O CLSI no ano de 1997 divulgou o documento padronizado para avaliação da sensibilidade antifúngica, o M27-A – Método de referência para teste de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras a terapia antifúngica. Desde então, o documento

já passou por três atualizações, sendo sua última versão, o M27-Ed4, publicada em 2017. Este documento propõe avaliar a sensibilidade *in vitro* de leveduras de importância médica (CLSI, 2017a).

Em 2002, foi publicado o documento M38-A – Método de referência para teste de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de fungos filamentosos. Em 2017, foi publicada a terceira edição deste documento (M38-Ed3), destinada a fungos filamentosos causadores infecções fúngicas. Atualmente, engloba as espécies *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus arrhizus*, *Scedosporium apiospermum* e *S. schenckii* na forma filamentosa, bem como, os dermatófitos *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. e *Epidermophyton* spp. (CLSI, 2017b).

Ambos os documentos se referem aos principais critérios a serem adotados para a realização dos testes de sensibilidade, tais como: meio de cultura padrão RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) – 1640, tamponado com o ácido 2-[N-morfolino]-propanossulfônico (MOPS) 0,165M a pH 7,0, a carga fúngica e o preparo do inóculo, tempo e temperatura de incubação, leitura visual e determinação de *breakpoints*. Ademais, também incluem as condições de ensaio para as drogas antifúngicas anfotericina B, os azólicos (itraconazol, cetoconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol), terbinafina, griseofulvina, ciclopirox olamina e as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) (CLSI, 2017b, 2017a).

A padronização para teste de sensibilidade com espécies de *Sporothrix* ainda não está totalmente estabelecida. O documento M27-Ed4 do CLSI não prevê testes de sensibilidade para a forma leveduriforme deste fungo e embora o documento M38-Ed3 traga uma proposta de padronização para testes com a forma filamentosa de *Sporothrix*, muitos pesquisadores citam a necessidade de adaptações do protocolo, principalmente quanto ao tempo de crescimento do microrganismo para leitura do teste (ALMEIDA-PAES et al., 2016a; BORBA-SANTOS et al., 2015; BRILHANTE et al., 2018b; SANCHOTENE et al., 2017; TRILLES et al., 2005). Outro ponto importante é a falta de pontos de corte para interpretação dos resultados dos testes de sensibilidade realizados com este fungo (CLSI, 2017b).

Recentemente dois estudos multicêntricos propuseram pontos de corte epidemiológicos para a interpretação dos testes de sensibilidade antifúngica de algumas drogas frente a forma filamentosa de espécies de *Sporothrix* spp. Embora os estudos tenham proposto apenas pontos de conte epidemiológico para a forma filamentosa do fungo, essa iniciativa representa um grande passo para a padronização da leitura dos teste de sensibilidade realizados com este microrganismo (ALMEIDA-PAES et al., 2017b; ESPINEL-INGROFF et al., 2017).



Os pontos de corte epidemiológicos propostos classificam os isolados testados entre cepas tidas como selvagens e não-selvagens. Os pontos de corte que classificariam as cepas como não-selvagens seriam  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  para anfotericina B,  $\geq 2 \mu\text{g/mL}$  para itraconazol e  $\geq 0,13 \mu\text{g/mL}$  para terbinafina (ESPINEL-INGROFF et al., 2017).

Embora os testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* ainda não sejam padronizados para a forma leveduriforme de *Sporothrix* spp., o documento M27-Ed4 tem sido utilizado com algumas adaptações para este propósito. Essas adaptações incluem principalmente a temperatura e duração de incubação e o critério de leitura (GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2014b; SANCHOTENE et al., 2017; TRILLES et al., 2005).

Ressalta-se que os protocolos citados são voltados para o estudo da concentração inibitória de antifúngicos em células planctônicas. Entretanto, sabe-se que muitos patógenos fúngicos, assim como *Sporothrix* spp., podem apresentar-se na forma de biofilme e que essa organização estrutural lhes confere proteção contra diversos compostos antifúngicos. Portanto, a avaliação do efeito dos compostos antifúngicos sobre biofilmes é um ponto importante a ser avaliado (VILA; ROZENTAL, 2016; WATERS; RATJEN, 2017).

### **2.3.1. Avaliação da atividade antifúngica em biofilmes**

Ainda que não existam protocolos únicos e padronizados para avaliação de biofilmes microbianos, Simitsopoulou, Chatzimoschou e Roilides (2016), propõem diversos métodos para avaliar a formação e a sensibilidade dos biofilmes à drogas antifúngicas. Os autores destacam dois grupos principais de análises, os colorimétricos e os microscópicos.

Tratando-se a avaliação da sensibilidade para verificar a eficácia de antimicrobianos no combate aos biofilmes, os métodos indicados por Gupta e Tuohy (2013) e Simitsopoulou, Chatzimoschou e Roilides (2016) são o ensaio de redução do XTT por ser rápido, reprodutível e amplamente utilizado em pesquisas científicas (BRILHANTE et al., 2018c; GAO; SUN, 2015; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2016; VALENTÍN et al., 2016; VILA et al., 2016), e de forma complementar, ensaios de microscopia como a microscopia confocal de varredura a laser (GUPTA; TUOHY, 2013; SIMITSOPOULOU; CHATZIMOSCHOU; ROILIDES, 2016).

Atualmente existe apenas uma ferramenta computacional destinada especializada na análise de imagens de biofilmes feitas por microscopia confocal, chamada “COMSTAT”. Essa ferramenta possui dentre suas funções a avaliação de biomassa e espessura dos biofilmes, trazendo resultados que podem se equiparar aos obtidos por metodologias como a coloração por cristal violeta. Embora seja uma ferramenta inovadora, a mesma não foi desenhada para

quantificação de parâmetros relacionados a viabilidade do biofilme que possam ser comparados, por exemplo, com resultados de ensaio de redução de XTT ou MTT, importantes na avaliação da atividade antifúngica de moléculas (HEYDORN et al., 2000b; KROM; WILLEMS, 2016). Sendo está uma função a ser explorada no desenvolvimento de novas ferramentas.

### 3 HIPÓTESES

- Terpinen-4-ol possui atividade antifúngica frente células planctônicas e biofilmes de *Sporothrix* spp. nas suas formas filamentosa e leveduriforme;
- Terpinen-4-ol apresenta sinergismo com anfotericina B, itraconazol e terbinafina frente células planctônicas e biofilmes de *Sporothrix* spp.
- As moléculas de *quorum sensing* farnesol, 2-feniletanol, tirosol e triptofol possuem atividade antifúngica frente células planctônicas e sésseis de *Sporothrix* spp. nas suas formas filamentosa e leveduriforme;
- As moléculas de *quorum sensing* farnesol, 2-feniletanol, tirosol e triptofol alteram, de forma distinta, a formação de biofilme de *Sporothrix* spp.;
- O desenvolvimento de um *plugin* para quantificação de fluorescência de imagens de microscopia confocal pode gerar resultados correlacionáveis com a quantificação de atividade metabólica dos biofilmes.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos de terpinen-4-ol e das moléculas *quorum sensing* farnesol, tirosol, 2-feniletanol e triptofol sobre a células planctônicas e biofilmes de *Sporothrix* spp. e desenvolver um *plugin* para quantificação da viabilidade celular por meio de intensidade de fluorescência.

### 4.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito antifúngico de Terpinen-4-ol frente células planctônicas e biofilmes de *Sporothrix* spp. nas suas formas filamentosa e leveduriforme;
- Analisar a interação de Terpinen-4-ol com anfotericina B, itraconazol e terbinafina frente células planctônicas e biofilmes de *Sporothrix* spp.
- Investigar a atividade antifúngica das moléculas de *quorum sensing* exógenas, farnesol, 2-feniletanol, tirosol e triptofol frente células planctônicas e sésseis de *Sporothrix* spp. nas suas formas filamentosa e leveduriforme;
- Determinar os efeitos das moléculas de *quorum sensing* exógenas, farnesol, 2-feniletanol, tirosol e triptofol sobre a formação de biofilme de *Sporothrix* spp. nas suas formas filamentosa e leveduriforme;
- Desenvolver um *plugin* para quantificação de fluorescência de imagens de biofilmes adquiridas por microscopia confocal de varredura a laser.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1. Local do estudo

As pesquisas foram realizadas nos laboratórios do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Universidade Federal do Ceará (UFC), com participação da Central analítica da UFC na obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

### 5.2. Microrganismos

Nesse estudo foram utilizadas 06 cepas de *S. brasiliensis*, 03 de *S. globosa*, 03 de *S. mexicana* e 03 de *S. schenckii sensu stricto* (Tabela 1).

**Tabela 1** – Origem e local de isolamento das cepas de *Sporothrix* spp. utilizadas neste estudo.

Cepas	Espécies	Origem
CEMM 05-3-052	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	gato
CEMM 05-3-075	<i>S. brasiliensis</i>	gato
CEMM 05-3-078	<i>S. brasiliensis</i>	gato
CEMM 05-3-087	<i>S. brasiliensis</i>	humano
CEMM 05-3-088	<i>S. brasiliensis</i>	humano
CEMM 05-3-089	<i>S. brasiliensis</i>	humano
CEMM 05-4-004	<i>Sporothrix globosa</i>	humano
CEMM 05-4-005	<i>S. globosa</i>	humano
CEMM 05-4-006	<i>S. globosa</i>	humano
CEMM 05-3-101	<i>Sporothrix mexicana</i>	humano
CEMM 05-4-008	<i>S. mexicana</i>	humano
CEMM 05-4-009	<i>S. mexicana</i>	humano
CEMM 05-3-090	<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i>	humano
CEMM 05-3-048	<i>S. schenckii s. str.</i>	humano
CEMM 05-3-097	<i>S. schenckii s. str.</i>	humano

Legenda: CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica.

Os isolados foram obtidos da coleção de cultura do Centro Especializado de Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil, possuindo identificação

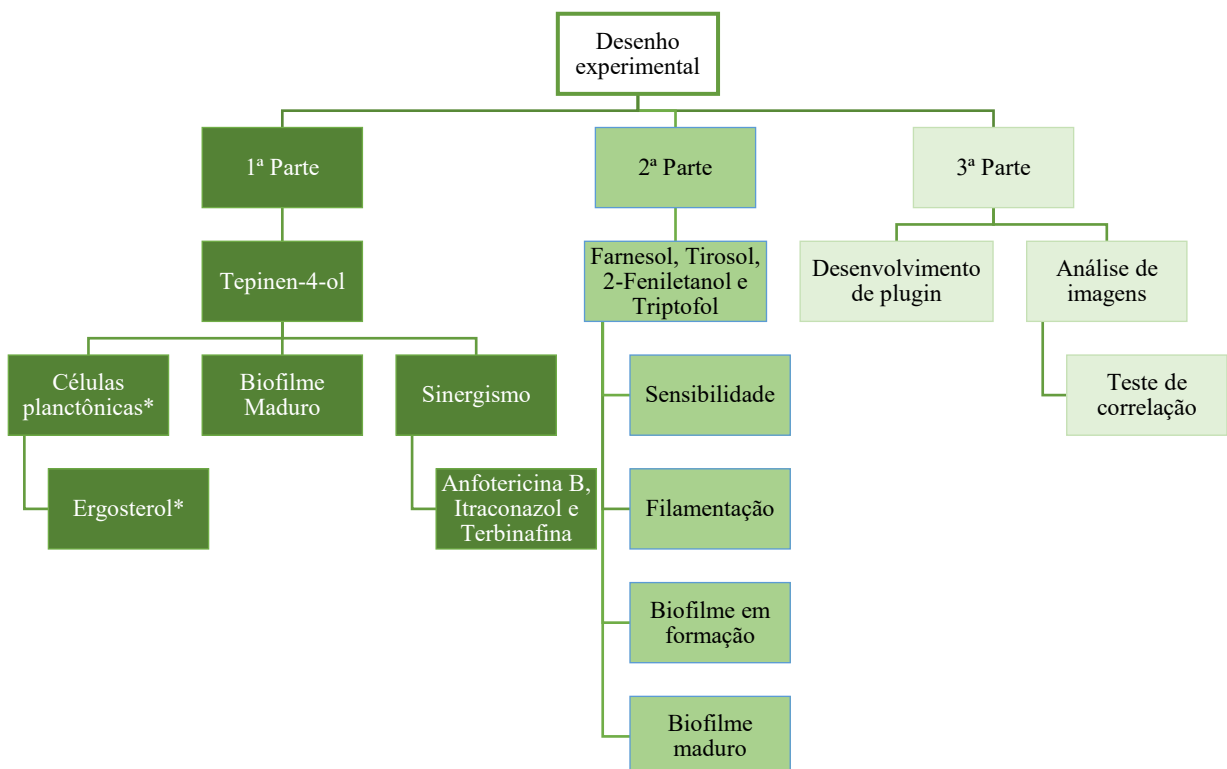
prévia pelo ensaio de PCR por amplificação da região do locus da calmodulina (RODRIGUES et al., 2013; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2013).

Para experimentação com a forma filamentosa, as cepas foram cultivadas em ágar batata dextrose (PDA, Himedia, Mumbai, Índia) e incubadas a 28 °C por 7 dias (CLSI, 2017b). A reversão das cepas de *Sporothrix* spp. para a forma leveduriforme foi realizada com repiques sucessivos das colônias em ágar Brain Heart Infusion (BHI, Himedia, Mumbai, Índia), suplementado com 5% de sangue de carneiro, incubados a 37 °C por 5 dias (BRILHANTE et al., 2019). Além disso, as cepas de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 foram usadas como controle nos experimentos de sensibilidade com células planctônicas (CLSI, 2017b).

### 5.3. Desenho experimental

Este trabalho foi organizado em três etapas (Figura 9).

**Figura 9** – Fluxograma de execução do trabalho.



A primeira parte constituiu na investigação dos efeitos do terpinen-4-ol no crescimento planctônico e na concentração de ergosterol de *Sporothrix* spp. na sua forma leveduriforme,

seus efeitos nos biofilmes filamentosos e leveduriformes e avaliação da sua interação com os antifúngicos anfotericina B, itraconazol e terbinafina em células planctônicas e sésseis. A segunda parte é composta pela determinação das concentrações inibitórias mínimas das moléculas de *quorum sensing* exógenas, farnesol, tirosol, 2-feniletil e triptofol contra células planctônicas de *Sporothrix* spp., bem como da avaliação dos efeitos desses compostos na formação de biofilme e sobre biofilmes maduros de *Sporothrix* spp. em suas formas filamentosas e leveduriformes. Finalmente a terceira etapa deste trabalho focou no desenvolvimento de um *plugin* para quantificação de fluorescência de imagens de biofilmes adquiridas através de microscopia confocal de varredura a laser.

## **1ª PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.4. Drogas teste**

Nessa etapa experimental utilizou-se o terpinen-4-ol (T-OH; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), anfotericina B (AMB; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), itraconazol (ITC; Janssen Pharmaceutica, Beerse, Bélgica) e terbinafina (TRB; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (BRILHANTE et al., 2016; CLSI, 2017b). Todas as drogas foram armazenadas a -20 ° C até o momento do uso.

### **5.5. Sensibilidade de células planctônicas leveduriformes**

Os testes de sensibilidade foram realizados com as 15 cepas de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme, utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo, conforme o documento M27-Ed4 (forma leveduriforme) do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017b), com adaptações. As drogas foram testadas em concentrações finais de 1-1024 µg/mL para terpinen-4-ol e 0,03-16 µg/ml para anfotericina B, itraconazol e terbinafina. Os inóculos foram preparados em solução salina e em seguida ajustados para uma concentração final de  $0,5-2,5 \times 10^3$  ufc/mL em meio RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO, USA), tamponado a pH 7,0 com 0,165M de MOPS (Sigma, St Louis, MO, USA). As microplacas foram incubadas a 37 °C por 96 h. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como sendo a menor concentração capaz de inibir 100% (AMB, ITC e T-OH), 80% (TRB, T-OH) ou 50% (T-OH) do crescimento fúngico visual em comparação com o crescimento fúngico nos poços livre de droga. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 foram utilizadas como

controles de qualidade dos experimentos. Os experimentos foram conduzidos em duplicata em dois momentos distintos.

A concentração fungicida mínima (CFM) de T-OH foi determinada semeando 100 µL do conteúdo de todos os poços sem crescimento visual de fungos em PDA, incubados a 28 °C por 7 dias. O CFM foi considerado a concentração mais baixa, onde não foi observado crescimento de colônias dos fungos (SCORDINO et al., 2015).

### **5.6. Quantificação do teor de ergosterol celular**

O efeito de T-OH na produção de ergosterol foi analisado pela quantificação de ergosterol celular nas 15 cepas de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme, de acordo com o procedimento descrito por Moran et al. (2007) e adaptado por Brilhante et al. (2016). A extração foi realizada após a exposição das células leveduriforme de *Sporothrix* spp. ao T-OH, itraconazol (controle positivo) e anfotericina B (controle negativo) na CIM, CIM/2, CIM/4 e CIM/8, por 96 horas, simulando a exposição realizada no teste de sensibilidade descrito anteriormente. Após a exposição, os inóculos foram transferidos para tubos Eppendorf e centrifugados a 12.000 × g por 5 min. Os sedimentos celulares foram suspensos em 500 µL de KOH alcoólico [solução de KOH 20% (p/v) em metanol 60% (v/v)] e depois incubada por 1 h a 95 °C em banho-maria. Após esse período, foram adicionados 600 µL de n-hexano para isolar os esteróis. Os tubos eppendorfs foram então centrifugados a 12.000 × g por 1 min, e toda a camada orgânica superior contendo os esteróis foi misturada com 500 µL de n-hexano em novos tubos eppendorfs e homogeneizadas em agitador Vórtex por 1 min. As leituras de absorbância foram realizadas a 295 nm e a quantificação do ergosterol foi realizada por comparação com uma curva padrão de ergosterol previamente determinada (Sigma-Aldrich, Alemanha). Os experimentos foram conduzidos em duplicata em dois momentos distintos.

### **5.7. Teste de sensibilidade de biofilmes maduros de *Sporothrix***

Para formação dos biofilmes filamentosos e leveduriformes, utilizou-se placas de 96 poços em fundo chato. Uma alíquota de 200 µL de suspensão fúngica a  $1 \times 10^6$  conídios/mL (forma filamentosa) ou  $2 \times 10^5$  células/mL (forma leveduriforme) preparada em meio RPMI 1640 foi adicionada a microplacas de 96 poços e incubado em estufa a 35 °C (forma filamentosa) ou 37 °C (forma leveduriforme) por 24 horas para adesão celular. Após esse período os poços foram lavados com PBS, preenchidos com 200 µL de meio RPMI e incubados



novamente por mais 120 horas (forma filamentosa) e 96 horas (forma leveduriforme), nas mesmas condições de temperatura, propiciando a formação do biofilme (BRILHANTE et al., 2019, 2018b). Depois de formados, os biofilmes foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e alíquotas de 200 µl de meio RPMI 1640 contendo diluições em série variando de 16-1024 µg/ml para T-OH e 8-256 µg/ml para AMB, ITC e TRB foram adicionadas às microplacas, que foram incubadas a 35 °C (forma filamentosa) ou 37 °C (forma de leveduriforme) por 72 horas (BRILHANTE et al., 2018a). Após a exposição, a sensibilidade dos biofilmes foi avaliada pela quantificação da biomassa e atividade metabólica e pela visualização morfológica através das técnicas de microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura (BRILHANTE et al., 2018b).

#### **5.7.1. Ensaio de quantificação de biomassa**

A biomassa dos biofilmes foi quantificada pela técnica de coloração por cristal violeta. Os poços contendo biofilmes foram lavados duas vezes com PBS, e fixados com metanol a 100% por 5 min (GQ - Grupo Química, São Paulo, Brasil). Então o metanol foi removido e os poços foram secos em temperatura ambiente. Em seguida foi adicionada, em cada poço, 200µL da solução de cristal violeta a 0,3%, por 20 min. Após esse período, os poços foram lavados, duas vezes, com água destilada. Os poços foram então descorados com a adição de uma solução de ácido acético a 33%. O conteúdo restante de cada poço foi então transferido para uma nova placa, onde foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm (BRILHANTE et al., 2018b). Todos os testes foram realizados em duplicata em dois momentos distintos.

#### **5.7.2. Ensaio de quantificação de atividade metabólica**

A atividade metabólica dos biofilmes foi quantificada pelo ensaio de redução do 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(Fenilamino) carbonil]-2H-tetrazólio (XTT; Sigma, Alemanha) (BRILHANTE et al., 2018b). O ensaio foi realizado utilizando uma solução mãe de XTT (1 mg/ml em PBS) e menadiona (1 mM em etanol). Foram adicionados 125 µl de solução XTT e 6 µl de solução de menadiona a todos os poços que continham biofilme e após 3 h de incubação a 35 °C, ao abrigo da luz, a mudança de cor foi medida com um espectrofotômetro a 492 nm. A concentração inibitória mínima em biofilme (CIMB) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir 50% (CIMB<sub>50</sub>) e 80% (CIMB<sub>80</sub>) da atividade metabólica do

biofilme, quando comparada à atividade metabólica do controle livre de drogas (PIERCE et al., 2008). Todos os testes foram realizados em duplicata em dois momentos distintos.

### **5.7.3. *Microscopia confocal de varredura a laser***

Para análise do impacto de T-OH nos biofilmes através da microscopia confocal de varredura a laser, utilizou-se uma cepa representativa de *S. brasiliensis* por esta ser a espécie considerada mais virulenta (DELLA TERRA et al., 2017), de forma mais específica a cepa CEMM 05-3-052, por ter os maiores valores de CIM dentre as cepas dessa espécie. Os biofilmes foram formados conforme descrito anteriormente, sobre lâminas de Thermanox® (Thermo Fisher Scientific, New York City, USA) em placas de 24 poços (BRILHANTE et al., 2018b; SILVA, 2017) e tratados com a CIMB<sub>80</sub> de T-OH. Logo após o período de tratamento os biofilmes foram lavados com tampão PBS e corados por 30 minutos com corante fluorescente Live/Dead (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As lâminas foram observadas em microscópio Confocal Nikon C2, utilizando lasers a 488 nm para detecção do fluorocromo Syto9, que identifica células vivas em fluorescência verde, e a 561nm para detecção do fluorocromo iodeto de propídeo, que identifica células mortas ou com dano de membrana, fluorescentes em vermelho. Para as análises, imagens tridimensionais foram coletadas de cinco pontos equidistantes do biofilme, a fim de se obterem resultados representativos da amostra (BRILHANTE et al., 2018b).

### **5.7.4. *Microscopia eletrônica de varredura***

Para análise do impacto de T-OH nos biofilmes através da microscopia eletrônicas de varredura, utilizou-se uma cepa representativa de *S. brasiliensis* (CEMM 05-3-052). Os biofilmes foram formados em pacas de 24 poços e tratados com CIMB<sub>80</sub> de T-OH, como descrito anteriormente. Logo após os biofilmes foram fixados com 1000 µL de solução de glutaraldeído 2,5% (Sigma Aldrich, St Louis, USA) em tampão cacodilato de sódio (0,15M) (Electron Microscopy Sciences, Hatfield) com azul de alcian 0,15% (Sigma Aldrich, St Louis, USA), pH 7,2. Os biofilmes ficaram em contato com o fixador por 6 horas a 25 °C. Após a fixação, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato de sódio (0,15M) e seguiu-se uma série de desidratações alcoólicas ascendente: 30, 50, 70, 80, 90 e 100% de etanol, por 10 minutos cada desidratação, repetindo-se mais uma vez a desidratação com etanol a 100%. Após secagem, os biofilmes foram desidratados com hexametildisilazano (Polysciences

Europe, Hirschberg an der Bergstraße, Germany) durante 15 minutos. Em seguida as lâminas foram recobertas com 20 nm de ouro (Emitech Q150T, Quorum Technologies Ltd, Laughton, Lincolnshire, England) e observados em microscópio eletrônico de varredura (Quanta FEG 450), em modo alto vácuo a 20 kV utilizando o detector de elétrons secundários (BRILHANTE et al., 2018b).

### 5.8. Ensaio de combinação de drogas - *checkerboard*

Para avaliação das interações entre T-OH e os antifúngicos AMB, ITC e TRB, foram selecionadas três cepas de cada espécie de *Sporothrix* ( $n = 12$ ), sendo as cepas de *S. brasiliensis* selecionadas por sua classificação como cepas não-selvagens (ESPINEL-INGROFF et al., 2017). Foram utilizadas as formas filamentosas e leveduriformes do fungo, aplicando o método de microdiluição em caldo por *checkerboard* (tabuleiro de xadrez) de 7 linhas x 11 colunas (ALMEIDA-PAES et al., 2016a).

Nos ensaios com células planctônicas utilizou-se combinações de concentrações variáveis de T-OH de 4 a 256  $\mu\text{g/ml}$  para a forma filamentosa e de 0,5 a 32  $\mu\text{g/ml}$  para a forma leveduriforme de *Sporothrix* spp., combinados com 0,007 a 8  $\mu\text{g/ml}$  AMB, ITC ou TRB. Os inóculos foram preparados para uma concentração final de  $0,4-5 \times 10^4$  ufc/ml (forma filamentosa) ou  $0,5-2,5 \times 10^3$  ufc/ml (forma leveduriforme) em meio RPMI 1640 como descrito anteriormente. As microplacas foram incubadas a 35 ° C (forma filamentosa) ou a 37 ° C por 96 h (forma de levedura) por 72 h e as CIMs foram definidas seguindo os pontos de leitura dos antifúngicos definidos no documento M38-Ed3 do CLSI (CLSI, 2017b).

Nos ensaios com biofilmes, os mesmos foram formados como descrito anteriormente em placas de 96 poços e expostos a concentrações combinadas das drogas, utilizando concentrações de 16 a 1024  $\mu\text{g/ml}$  de T-OH para a forma filamentosa e de 4 a 256  $\mu\text{g/ml}$  para a forma leveduriforme, combinadas com 0,25 a 256  $\mu\text{g/ml}$  de AMB, ITC ou TRB (GAO et al., 2017).

Os valores de CIM ou CIMB<sub>80</sub> obtidos foram utilizados para determinar o índice de concentração inibitória fracionária (ICIF), e a interação foi considerada sinérgica quando  $\text{ICIF} \leq 0,5$ , indiferente quando  $0,5 < \text{ICIF} \leq 4$  e antagonista quando  $\text{ICIF} \geq 4$  (ODDS, 2003). Os experimentos foram realizados em duplicata em dois momentos distintos.

## 5.9. Análises estatísticas

Nas comparações entre dados que apresentaram distribuição normal e variâncias semelhantes, foi utilizado o teste de T de Student ou ANOVA seguido do pós-teste de Tukey's. Nas comparações em que os dados apresentaram assimetria foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon ou Friedman seguidos do pós-teste de Dunn's. Em todas as situações, o nível de significância máximo, adotado para conclusões afirmativas, foi de 95 % ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## 2ª PARTE EXPERIMENTAL

### 5.10. Drogas teste

Nesta segunda parte experimental utilizou-se as moléculas moduladoras de *quorum sensing* exógenas, farnesol (FAR), 2-feniletanol (F-OH), tirosol (TIR) e triptofol (TRP), todas adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). FAR e F-OH foram diluídas em metanol enquanto TIR e TRP foram solubilizados em água destilada. Com exceção do FAR e F-OH que foram preparadas sempre no momento de uso, todas as outras drogas foram preparadas e armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso (CORDEIRO et al., 2015; SINGKUM et al., 2019; WONGSUK; LUPLERTLOP; SUKPHOPETCH, 2020).

### 5.11. Sensibilidade de células planctônicas às moléculas de *quorum sensing*

Os testes de sensibilidade foram realizados com as 15 cepas de *Sporothrix* spp. em ambas as suas formas, filamentosa e leveduriforme, utilizando a técnica de microdiluição. Para os ensaios com a forma leveduriforme do fungo utilizou-se metodologia descrita anteriormente. Para os testes com a forma filamentosa utilizou-se o protocolo descrito no documento M38-Ed3 do CLSI, com adaptações. O inóculo da forma filamentosa de *Sporothrix* spp. foi preparado em solução salina e ajustados para a concentração final de  $0,45 \times 10^4$  ufc/mL em meio RPMI 1640 (Sigma, St Louis, EUA), tamponado para pH 7,0 com MOPS 0,165 M (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). As MQSs foram testadas em concentrações finais variando de 0,007 a 4  $\mu\text{M}$  de farnesol (BRILHANTE et al., 2015b), 0,03 a 16 mM de 2-feniletanol, tirosol e triptofol (WONGSUK; LUPLERTLOP; SUKPHOPETCH, 2020). As placas foram incubadas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$

por 72 h (forma filamentosa) ou a 37 °C por 96 h (forma leveduriforme). A CIM das MQSs foi definida como a menor concentração capaz de inibir 80% do crescimento de fungos visual, quando comparado ao controle de crescimento livre de drogas. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 foram usadas como controle de qualidade em cada ensaio (CLSI, 2017b). Os testes foram realizados em duplicata em dois momentos diferentes.

### **5.12. Efeito de MQSs na filamentação de *Sporothrix* spp.**

O ensaio de filamentação foi realizado segundo o método descrito por Bernardo et al. (2014), com adaptações. Uma cepa representativa (*S. brasiliensis* CEMM 05-3-05) foi usada nos testes. Resumidamente, uma densidade celular de  $10^6$  conídios/ml foi preparada em meio RPMI 1640 e exposta a uma concentração de farnesol a 0,031  $\mu$ M, 2-feniletanol a 0,5 mM e tirosol a 1 mM. As células foram então incubadas a 30 °C por até 72 horas. O desenvolvimento de hifas foi monitorado em momentos específicos (0, 24, 48 e 72 h) usando técnicas de campo claro com um microscópio óptico Olympus BX41. As imagens foram capturadas com uma câmera digital Olympus DP71.

### **5.13. Efeito de MQSs nos biofilmes de *Sporothrix* spp.**

#### **5.13.1. Análise na etapa de formação**

O efeito dos MQSs na formação de biofilme de *Sporothrix* spp. foi avaliado utilizando 15 cepas nas formas filamentosa e leveduriforme. Inóculos de células de *Sporothrix* spp. na forma filamentosa e leveduriforme foram preparados e incubados em placas de 96 poços para processo de adesão celular como descrito anteriormente. Após 24 horas, os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril para remover células não aderentes e o meio RPMI 1640 foi adicionado com diferentes concentrações sub-inibitórias de MQSs. Nos experimentos com biofilmes filamentosos, foram utilizados 0,004 - 0,063  $\mu$ M de FAR, 0,06 - 1 mM de F-OH, 0,125 - 2 mM de TIR e 1 - 16 mM de TRP, com posterior incubação a 35 °C por 120 h. Nos ensaios com biofilmes da forma leveduriforme utilizou-se 0,002 - 0,031  $\mu$ M de FAR, 0,03 - 0,5 mM de F-OH, 0,03 - 0,5 mM de TIR e 1 - 16 mM de TRP, com posterior incubação a 37 °C por 96 h. Controles negativos (apenas meio RPMI) e controles positivos (apenas inóculo e RPMI) foram utilizados em cada teste. O efeito do contato com as moléculas foi avaliado quantificando a biomassa e atividade metabólica e análise da estrutura e morfologia dos biofilmes por

microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura, como descrito anteriormente.

### **5.13.2. Análise no biofilme maduro**

Os biofilmes foram formados como descritos anteriormente. As MQSs foram utilizadas nesta etapa em concentrações inibitórias variando de 0,125-64  $\mu$ M para farnesol, 0,125-64 mM para 2-feniletanol e 0,25-128 mM para tirosol e triptofol. As placas foram incubadas a 35 °C (forma filamentosa) e 37 °C (forma leveduriforme) por 72 h. Após a exposição, a suscetibilidade dos biofilmes as MQSs foi avaliada pela quantificação da atividade metabólica, como descrito anteriormente. A CIMB foi determinada como a menor concentração capaz de causar 50% (CIMB<sub>50</sub>) de inibição da atividade metabólica do biofilme em comparação com a atividade metabólica do controle sem drogas (XIA et al., 2017).

### **5.14. Análises estatísticas**

Nas comparações entre dados que apresentaram distribuição normal e variâncias semelhantes, foi utilizado o teste de T de Student ou ANOVA seguido do pós-teste de Tukey's. Nas comparações em que os dados apresentaram assimetria foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon ou Friedman seguidos do pós-teste de Dunn's. Em todas as situações, o nível de significância máximo, adotado para conclusões afirmativas, foi de 95 % ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## **3ª PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.15. Aquisição de dados prévios**

Para o desenvolvimento do *plugin* coletamos imagens de microscopia confocal de varredura a laser e quantificações de XTT de biofilmes de *Sporothrix* spp. Para tal, utilizou-se três cepas de *S. brasiliensis* (CEMM 05-3-052; CEMM 05-3-075; CEMM 05-3-088). Os biofilmes foram formados como descrito anteriormente e tratados com 32  $\mu$ g/ml e 128  $\mu$ g/ml de ITC. Após exposição os biofilmes foram quantificados quanto a sua atividade metabólica e

as imagens de microscopia confocal foram registradas, como descrito anteriormente. As aquisições foram realizadas em triplicata em três momentos distintos.

Ao total compunham o banco de dados para esta etapa experimental 81 leituras de absorvância e imagens de microscopia [27 de controle (biofilmes não tratados), 27 de biofilmes tratados com 32 µg/ml de ITC e 27 de biofilmes tratados com 128 µg/ml de itraconazol).

## 5.16. Desenvolvimento de *plugin* para análise de biofilme

O desenvolvimento do *plugin* foi realizado para atender a quantificação de fluorescências de imagens de biofilmes adquiridas por microscopia confocal de varredura a laser. Como modelos para o desenho da ferramenta utilizou-se imagens de biofilmes de *Sporothrix brasiliensis* corados com o kit comercial *Live/Dead*, composto pelos fluoróforos Syto9 e iodeto de propídio. As imagens foram obtidas em microscópio Nikon C2 utilizando os lasers de 488 nm para detecção do fluorocromo Syto9, que identifica células vivas, e de 561nm para detecção do fluorocromo iodeto de propídeo, que identifica células mortas ou com dano de membrana.

### 5.16.1. Escolha do software de incorporação

Buscou-se na literatura sistemas que atendessem aos seguintes critérios: ser executável em Linux, Mac OS e Windows; possuir código aberto; ser extensível através de plugins; permitir a manipulação de imagens de 8, 16 e 32 bits/pixel e RGB; trabalhar com pilhas (stacks) de imagens; permitir a aplicação de tabelas de cores às imagens; abrir e/ou salvar imagens em diversos tipos de arquivos, tais como: GIF, JPEG, PNG, PGM, ASCII, TIFF, ND2, LSM e DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine).

### 5.16.2. Estruturação dos comandos do *plugin*

---

message =

```
"Plugin QuantyFilm                                \n"
+"                                                \n"
+"Original QuantyFilm version, 18-05-2020
\n"
```





```

// Opening a color image of the confocal microcopy

requires("1.35b");
if (bitDepth!=24)
    exit("This macro requires an RGB image");

/////////////////////////////////////////////////////////////////
// Clearing table with results and removing overlay

run("Remove Overlay");

/////////////////////////////////////////////////////////////////
// Choice of color for intensity measurements

color=newArray("Live/Dead");

Dialog.create("QuantyFilm");

Dialog.addChoice("Protocol:", color);

Dialog.show();
color = Dialog.getChoice();

    setRGBWeights(0.274, 0, 0);
    run("Measure");
    intensity = getResult("Mean");
    setResult("Dye", nResults-1, "PI");
    setResult("Result", nResults-1, (log(10)/log(255/intensity)));

    setRGBWeights(0, 0.496, 0);
    run("Measure");
    intensity = getResult("Mean");
    setResult("Dye", nResults-1, "Syto9");
    setResult("Result", nResults-1, (log(10)/log(255/intensity)));

```

```
setRGBWeights(0.274, 0.496, 0);  
run("Measure");  
intensity = getResult("Mean");  
setResult("Dye", nResults-1, "All");  
setResult("Result", nResults-1, (log(10)/log(255/intensity)));  
  
updateResults();  
// weights uses in ImageJ 1.48 and earlier
```

---

### **5.16.3. Análise dos dados gerados**

Os dados da quantificação de fluorescência de Syto9 e iodeto de propídio obtidos pelo *plugin* e os dados de absorvância de atividade metabólica dos biofilmes foram normalizados em porcentagem de inibição tendo como base os resultados do biofilme formado livre de droga. A partir dos resultados foi feita análise de correlação de Pearson e T de Student seguido do pós-teste de Tukey's. Em todas as situações, o nível de significância máximo, adotado para conclusões afirmativas, foi de 95 % ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## 6 RESULTADOS

### 1ª PARTE EXPERIMENTAL

#### 6.1. Efeito de T-OH em células planctônicas leveduriformes

O T-OH apresentou atividade antifúngica contra a forma leveduriforme de *Sporothrix* spp., com diferentes valores de CIM e CFM (Tabela 2).

**Tabela 2** - Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de antifúngicos e terpinen-4-ol em células planctônicas da forma leveduriforme de *Sporothrix* spp.

Espécie	Agentes antifúngicos			T-OH			
	AMB	ITC	TRB	T-OH			CFM
	CIM 100%	CIM 100%	CIM 80% 50%	CIM 80%	100%		
<i>Sporothrix brasiliensis</i>							
CEMM 05-3-052	0,25	0,25	0,031	4	16	32	64
CEMM 05-3-075	0,125	0,5	0,125	1	4	16	64
CEMM 05-3-078	0,5	0,25	0,031	8	32	64	128
CEMM 05-3-087	0,0625	0,5	0,031	1	4	16	64
CEMM 05-3-088	0,25	0,25	0,125	4	8	16	32
CEMM 05-3-089	0,5	1	0,125	8	32	64	128
<i>Sporothrix globosa</i>							
CEMM 05-4-004	0,25	0,25	0,031	2	8	16	128
CEMM 05-4-005	0,0312	0,032	0,031	2	16	32	64
CEMM 05-4-006	0,0625	0,25	0,125	8	16	64	128
<i>Sporothrix mexicana</i>							
CEMM 05-3-101	0,5	0,25	0,031	4	16	32	64
CEMM 05-4-008	0,25	0,25	0,125	8	16	64	256
CEMM 05-4-009	0,5	1	0,125	2	8	32	128
<i>Sporothrix schenckii</i>							
<i>Sensu stricto</i>							
CEMM 05-3-090	0,0625	0,5	0,031	4	8	32	64
CEMM 05-3-048	0,125	0,5	0,125	8	16	64	128
CEMM 05-4-002	0,0625	0,25	0,125	8	16	64	128

CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica. AMB: Anfotericina B. ITC: Itraconazol. TRB: Terbinafina. T-OH: Terpinen-4-ol. CIM: Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ). CFM: Concentração Fungicida Mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ).

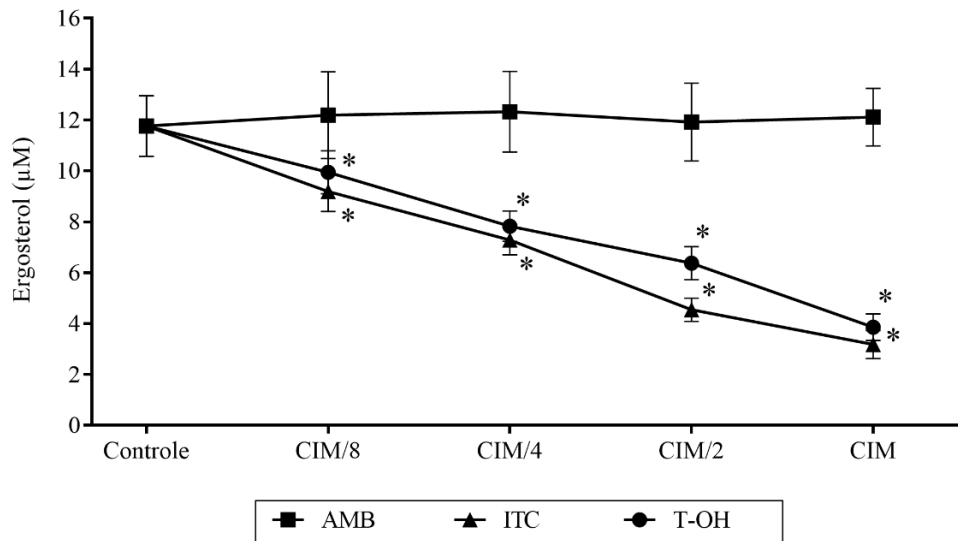
No que tange os resultados de sensibilidade, AMB apresentou média de CIM de 0,22 µg/ml para *S. brasiliensis*, 0,08 µg/ml para *S. globosa* e *S. schenckii s. str.* e 0,4 µg/ml para *S. mexicana*. ITC apresentou média de CIM de 0,4 µg/ml para *S. brasiliensis*, *S. mexicana* e *S. schenckii s. str.* e 0,13 µg/ml para *S. globosa*. TRB apresentou média de CIM de 0,06 µg/ml para *S. brasiliensis*, 0,05 µg/ml para *S. globosa* e 0,08 µg/ml para *S. mexicana* e *S. schenckii s. str.*

Quanto aos valores de CIM de T-OH foi determinado em três pontos de leitura, 50%, 80% e 100%. Nas leituras de 50% a média de CIM foi de 3,17 µg/ml para *S. brasiliensis* e *S. globosa*, 4 µg/ml para *S. mexicana* e 6,35 µg/ml para *S. schenckii s. str.* Nas leituras de 80% a média foi de 11,31 µg/ml para *S. brasiliensis* e 12,7 µg/ml para *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. schenckii s. str.* Por último a leitura de 100% revelou valores médios de CIM de 28,51 µg/ml para *S. brasiliensis*, 32 µg/ml para *S. globosa*, 40,32 µg/ml para *S. mexicana* e 50,80 µg/ml para *S. schenckii s. str.* Por sua vez, foram obtidos valores de MFC médio de 71,84 µg/ml para *S. brasiliensis*, de 101,59 µg/ml para *S. globosa* e *S. schenckii s. str.* e de 128 µg/ml para *S. mexicana*.

## **6.2. Influência de T-OH no teor de ergosterol celular**

O impacto da exposição de células leveduriforme de *Sporothrix* spp. a diferentes concentrações de T-OH, por 96 horas, está representado na Figura 10. Diminuições significativas ( $P < 0,05$ ) na quantidade de ergosterol extraída das células fúngicas foram observadas em todas as concentrações de T-OH avaliadas. Resultados semelhantes foram observados para a exposição ao ITC (controle positivo), enquanto a exposição a AMB (controle negativo) não causou alterações na concentração de ergosterol.

**Figura 10** - Quantificação do conteúdo de ergosterol celular de *Sporothrix* spp. após exposição a diferentes concentrações de terpinen-4-ol.



CIM: concentração inibitória mínima. AMB: anfotericina B. ITC: itraconazol. T-OH: terpinen-4-ol. Leitura realizada a 295 nm para detectar a concentração de ergosterol, usando AMB como controle negativo e ITC como controle positivo para redução do teor de ergosterol. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

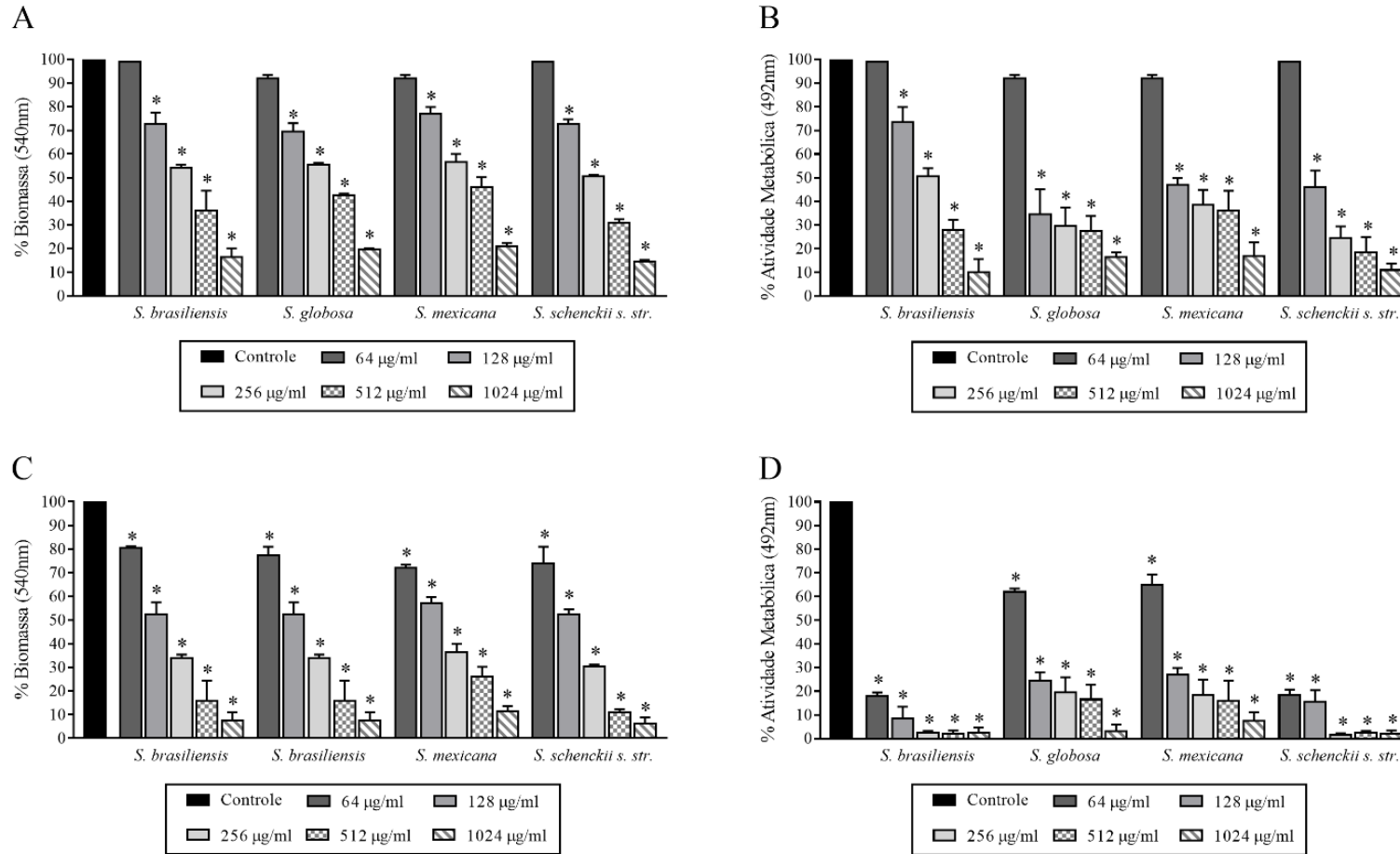
### 6.3. Efeito da exposição de biofilmes de *Sporothrix* ao T-OH

A exposição de biofilmes maduros de *Sporothrix* spp. ao T-OH causou reduções na biomassa e na atividade metabólica dos biofilmes, tanto na forma filamentosa quanto na forma leveduriforme do fungo (Figura 11).

Para os biofilmes da forma filamentosa, foram observadas reduções significativas de biomassa e atividade metabólica a partir da concentração de 128  $\mu\text{g/ml}$  T-OH ( $p < 0,05$ ) (Figura 9A e 9B), com CIMB<sub>50</sub> de 256  $\mu\text{g/ml}$  para *S. brasiliensis* e de 128  $\mu\text{g/ml}$  para as outras espécies. A CIMB<sub>80</sub> foi determinada como 512  $\mu\text{g/ml}$  para *S. schenckii* s. str. e 1.024  $\mu\text{g/ml}$  para as demais espécies.

Para os biofilmes da forma leveduriforme, foram observadas reduções significativas na biomassa e na atividade metabólica em concentrações a partir de 64  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ), com CIMB<sub>50</sub> de 64  $\mu\text{g/ml}$  para *S. brasiliensis* e *S. schenckii* s. str. e 128  $\mu\text{g/ml}$  para *S. globosa* e *S. mexicana*. Para a CIMB<sub>80</sub>, também houve variações entre as espécies, com valores de 64  $\mu\text{g/ml}$  para *S. brasiliensis* e *S. schenckii* s. str. e 512  $\mu\text{g/ml}$  para *S. globosa* e *S. mexicana*.

**Figura 11** - Efeito de terpinen-4-ol em biofilmes da forma filamentosa e leveduriforme de *Sporothrix* spp.



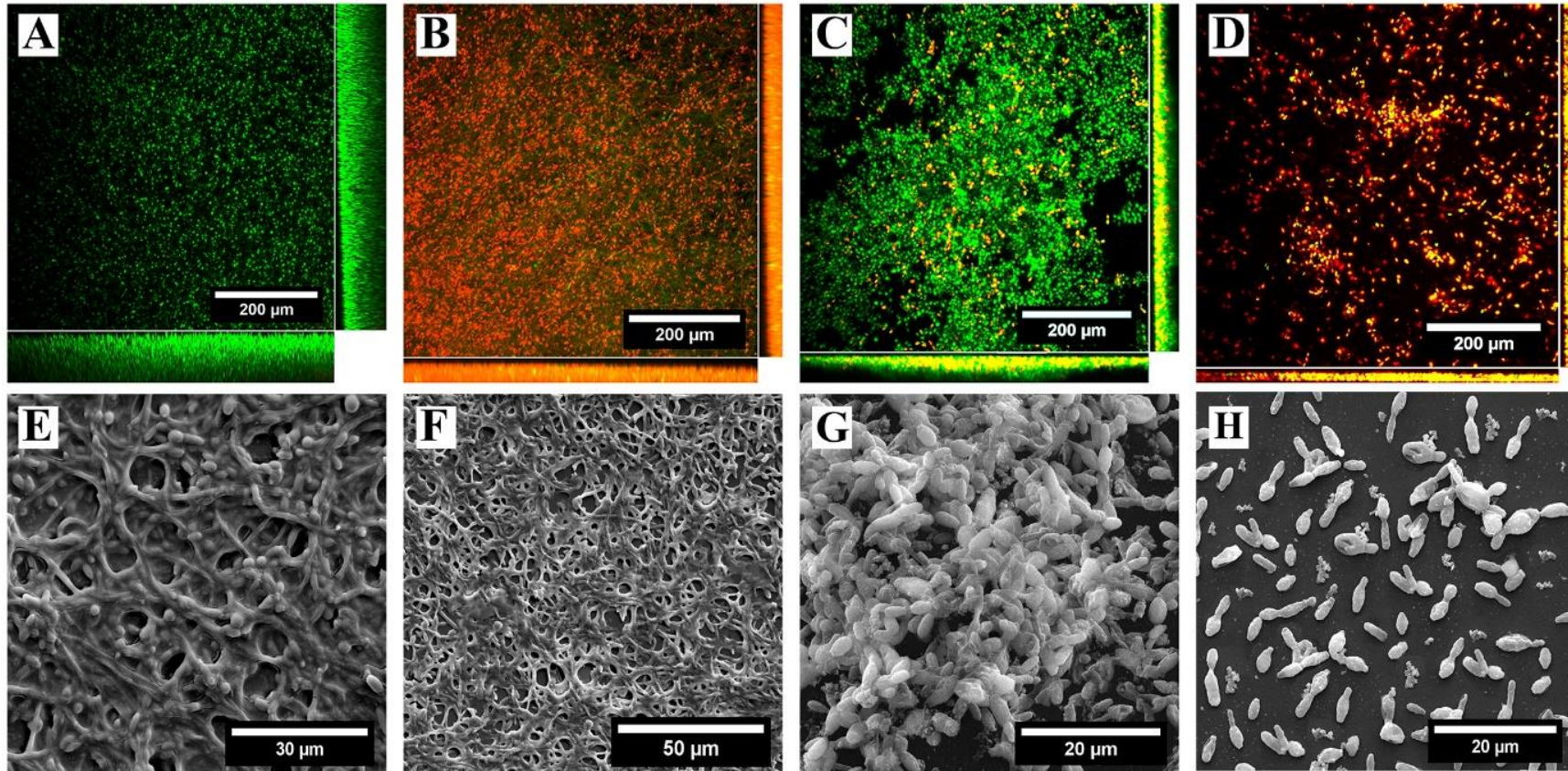
Percentual de biomassa (A e C) e atividade metabólica (B e D) dos biofilmes de *Sporothrix* spp. nas formas filamentosa (A e B) e leveduriforme (C e D), expostos a diferentes concentrações de terpinen-4-ol. Resultados expressos por média  $\pm$  desvio padrão. Asteriscos representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (crescimento livre de drogas).

#### 6.4. Efeito de T-OH na estrutura e morfologia de biofilmes de *Sporothrix*

Através da microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar a estrutura dos biofilmes de *Sporothrix* que foram expostos ao T-OH (Figura 12).

O biofilme da forma filamentosa de *Sporothrix* sp., exposto a T-OH (1024 µg/ml), apresentou densidade celular reduzida (Figura 12B e 12F) quando comparados ao controle (Figura 12A e 12E). O biofilme resultante dessa exposição era composto principalmente de células mortas ou com danos à membrana (Figura 12B), e espessura reduzida em 57%. Quanto ao biofilme da forma leveduriforme de *Sporothrix* sp., após exposição ao T-OH (64 µg/ml), foi possível observar uma redução na massa celular e espessura do biofilme (Figura 12D e 12H). A estrutura de aglomerados de blastoconídios já não era mais percebida após o tratamento (Figura 12H), e as células que ainda estavam presentes nas lâminas de Thermanox apresentavam-se com viabilidade viável reduzida, como pode-se notar na figura 12D.

**Figura 12** – Micrografias de biofilmes de *Sporothrix* expostos ao terpinen-4-ol.



Imagens em microscopia confocal de varredura a laser e eletrônica de varredura de *Sporothrix brasiliensis* (CEMM 05-3-052) nas formas filamentosas (A, B, E e F) e leveduriforme (C, D, G e H). A, C, E e G: Biofilmes maduros sem exposição ao terpinen-4-ol. B, D, F e H: Biofilmes maduros expostos por 72 h ao terpinen-4-ol, em sua concentração inibitória mínima capaz de reduzir 80% da atividade metabólica do biofilme (CIMB<sub>80</sub>). Magnitude: 5200 × (H), 5000 × (G), 4032 × (E), 2500 × (F) e 400 × (A – D). Escala: 200 μm (A – D), 50 μm (F), 30 μm (E) e 20 μm (G & H). Lasers: 488 nm para detecção de SYTO9 (células viáveis em verde) e 561 nm para detecção de iodeto de propídio (células mortas ou com dano de membrana em vermelho).



### **6.5. Interação entre T-OH e antifúngicos em células planctônicas**

Os valores de CIM dos antifúngicos AMB, ITC e TRB, isolados ou combinados com T-OH, bem como o ICIF obtido para as formas filamentosas e leveduriforme de *Sporothrix* spp., são mostrados na Tabela 3 e 4. Nas combinações de T-OH com os antifúngicos frente a forma filamentosa de *Sporothrix* spp., obteve-se sinergismo com ITC e TRB com todas as cepas testadas. Nestas combinações as CIMs dos antifúngicos foram 4 a 16 vezes menores que as observadas isoladamente. Por outro lado, as combinações com AMB foram todas indiferentes e nenhuma interação de antagonismo foi observada.

Nos testes com a forma leveduriforme do fungo, resultados semelhantes foram observados. A combinação de T-OH e ITC e TRB foram sinérgicas em 11/12 cepas testadas, com indiferença em apenas uma cepa de *S. globosa* para a combinação com ITC e uma cepa de *S. mexicana* para a combinação com TRB. Assim como na forma filamentosa, apenas relações de indiferenças foram observadas nas combinações com AMB e nenhuma relação de antagonismo foi encontrada.

### **6.6. Interação entre T-OH e antifúngicos em biofilmes maduros**

Os valores de CIMB<sub>80</sub> para os antifúngicos isolados ou combinados com T-OH, bem como o ICIF obtido para a combinação contra os biofilmes das formas filamentosas e leveduriformes de *Sporothrix* spp., são mostrados nas Tabela 5 e 6.

**Tabela 3** – Concentração inibitória mínima e índice de concentração inibitória fracionada para a combinação de terpinen-4-ol com anfotericina B, itraconazol e terbinafina, frente células planctônicas de *Sporothrix* spp., na forma filamentosa.

Cepas	Concentração inibitória mínima (µg/ml)							Índice de concentração inibitória fracionada		
	Isoladas				Combinadas			T-OH + AMB	T-OH + ITC	T-OH + TRB
	T-OH	AMB	ITC	TRB	T-OH + AMB	T-OH + ITC	T-OH + TRB			
<i>Sporothrix brasiliensis</i>										
CEMM 05-3-052	128	4	2	0,125	32 / 2	16 / 0,5	16 / 0,031	0,75 <sup>I</sup>	0,375 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
CEMM 05-3-075	16	2	2	0,063	4 / 2	4 / 0,25	4 / 0,016	1,25 <sup>I</sup>	0,375 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
CEMM 05-3-088	16	2	2	0,063	2 / 1	4 / 0,25	4 / 0,008	0,625 <sup>I</sup>	0,188 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
<i>Sporothrix globosa</i>										
CEMM 05-4-004	32	0,5	2	0,063	4 / 0,25	8 / 0,25	8 / 0,008	0,625 <sup>I</sup>	0,375 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-005	16	2	1	0,063	2 / 1	2 / 0,25	4 / 0,008	0,625 <sup>I</sup>	0,375 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-006	16	1	0,5	0,125	4 / 1	4 / 0,125	4 / 0,031	1,25 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
<i>Sporothrix mexicana</i>										
CEMM 05-3-101	64	1	0,5	0,125	16 / 0,5	16 / 0,125	16 / 0,031	0,75 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-008	32	4	2	0,25	8 / 4	8 / 0,5	4 / 0,063	1,25 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-009	16	1	2	0,125	4 / 1	4 / 0,5	4 / 0,031	1,25 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i>										
CEMM 05-3-090	64	0,25	1	0,25	16 / 0,125	16 / 0,25	8 / 0,063	0,75 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
CEMM 05-3-048	32	1	0,5	0,125	8 / 2	8 / 0,125	8 / 0,031	2,25 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-002	64	1	0,5	0,125	16 / 1	8 / 0,063	16 / 0,031	1,25 <sup>I</sup>	0,25 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>

CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica. T-OH: Terpinen-4-ol. AMB: Anfotericina B. ITC: Itraconazol. TRB: Terbinafina. <sup>S</sup>: Sinergismo. <sup>I</sup>: Indiferença.

**Tabela 4** - Concentração inibitória mínima e índice de concentração inibitória fracionada para a combinação de terpinen-4-ol com anfotericina B, itraconazol e terbinafina, frente células planctônicas de *Sporothrix* spp., na forma leveduriforme.

Cepas	Concentração inibitória mínima (µg/ml)							Índice de concentração inibitória fracionada		
	Isoladas				Combinadas			T-OH + AMB	T-OH + ITC	T-OH + TRB
	T-OH	AMB	ITC	TRB	T-OH + AMB	T-OH + ITC	T-OH + TRB			
<i>Sporothrix brasiliensis</i>										
CEMM 05-3-052	16	0,25	0,25	0,031	16 / 0,25	4 / 0,063	4 / 0,008	2 <sup>1</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
CEMM 05-3-075	4	0,125	0,5	0,125	4 / 0,125	1 / 0,125	1 / 0,031	2 <sup>1</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
CEMM 05-3-088	8	0,25	0,25	0,125	8 / 0,25	2 / 0,063	1 / 0,031	2 <sup>1</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
<i>Sporothrix globosa</i>										
CEMM 05-4-004	8	0,25	0,25	0,031	8 / 0,25	2 / 0,031	2 / 0,008	2 <sup>1</sup>	0,375 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-005	16	0,031	0,031	0,031	32 / 0,063	4 / 0,016	4 / 0,008	3 <sup>1</sup>	0,75 <sup>1</sup>	0,5 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-006	16	0,063	0,25	0,125	16 / 0,063	2 / 0,031	2 / 0,031	2 <sup>1</sup>	0,25 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
<i>Sporothrix mexicana</i>										
CEMM 05-3-101	16	0,5	0,25	0,031	32 / 1	4 / 0,016	4 / 0,031	3 <sup>1</sup>	0,313 <sup>S</sup>	1,25 <sup>1</sup>
CEMM 05-4-008	16	0,25	0,25	0,125	16 / 0,25	2 / 0,016	2 / 0,031	2 <sup>1</sup>	0,188 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-009	8	0,5	1	0,125	4 / 0,25	2 / 0,125	2 / 0,008	1 <sup>1</sup>	0,375 <sup>S</sup>	0,313 <sup>S</sup>
<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i>										
CEMM 05-3-090	8	0,063	0,5	0,031	8 / 0,063	2 / 0,125	1 / 0,008	2 <sup>1</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
CEMM 05-3-048	16	0,125	0,5	0,125	32 / 0,125	4 / 0,063	2 / 0,031	3 <sup>1</sup>	0,375 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-002	16	0,063	0,25	0,125	32 / 0,125	4 / 0,031	4 / 0,031	3 <sup>1</sup>	0,375 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>

CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica. T-OH: Terpinen-4-ol. AMB: Anfotericina B. ITC: Itraconazol. TRB: Terbinafina. <sup>S</sup>: Sinergismo. <sup>1</sup>: Indiferença.

**Tabela 5** - Concentração inibitória mínima em biofilme e índice de concentração inibitória fracionada para a combinação de terpinen-4-ol com anfotericina B, itraconazol e terbinafina, frente biofilmes de *Sporothrix* spp., na forma filamentosa.

Cepas	Concentração inibitória mínima em biofilme ( $\mu\text{g/ml}$ )							Índice de concentração inibitória fracionada		
	Isoladas				Combinadas			T-OH + AMB	T-OH + ITC	T-OH + TRB
	T-OH	AMB	ITC	TRB	T-OH + AMB	T-OH + ITC	T-OH + TRB			
<i>Sporothrix brasiliensis</i>										
CEMM 05-3-052	1024	128	128	16	256 / 128	256 / 32	256 / 4	1,25 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
CEMM 05-3-075	1024	128	128	8	128 / 128	128 / 16	128 / 2	1,125 <sup>I</sup>	0,25 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
CEMM 05-3-088	1024	32	128	64	512 / 16	256 / 32	256 / 16	1 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
<i>Sporothrix globosa</i>										
CEMM 05-4-004	2048	64	128	8	1024 / 64	1024 / 32	512 / 2	1,5 <sup>I</sup>	0,75 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-005	2048	128	128	16	512 / 64	512 / 32	256 / 4	0,75 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-006	2048	64	64	16	1024 / 128	1024 / 32	512 / 4	2,5 <sup>I</sup>	1 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>
<i>Sporothrix mexicana</i>										
CEMM 05-3-101	2048	128	64	16	512 / 256	512 / 64	256 / 4	2,25 <sup>I</sup>	1,25 <sup>I</sup>	0,375 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-008	2048	128	128	64	1024 / 64	512 / 32	512 / 8	1 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-009	2048	64	128	32	1024 / 16	1024 / 128	512 / 8	0,75 <sup>I</sup>	1,5 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>
<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i>										
CEMM 05-3-090	512	32	128	32	1024 / 16	128 / 32	128 / 8	2,5 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
CEMM 05-3-048	1024	128	64	16	512 / 256	256 / 16	256 / 4	2,5 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-002	512	128	64	16	512 / 128	128 / 16	128 / 2	2 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>

CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica. T-OH: Terpinen-4-ol. AMB: Anfotericina B. ITC: Itraconazol. TRB: Terbinafina. <sup>S</sup>: Sinergismo. <sup>I</sup>: Indiferença.

**Tabela 6** - Concentração inibitória mínima em biofilme e índice de concentração inibitória fracionada para a combinação de terpinen-4-ol com anfotericina B, itraconazol e terbinafina, frente biofilmes de *Sporothrix* spp., na forma leveduriforme.

Cepas	Concentração inibitória mínima em biofilme ( $\mu\text{g/ml}$ )							Índice de concentração inibitória fracionada		
	Isoladas				Combinadas			T-OH + AMB	T-OH + ITC	T-OH + TRB
	T-OH	AMB	ITC	TRB	T-OH + AMB	T-OH + ITC	T-OH + TRB			
<i>Sporothrix brasiliensis</i>										
CEMM 05-3-052	64	64	16	8	16 / 64	16 / 4	16 / 2	1,25 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
CEMM 05-3-075	64	16	64	16	8 / 16	8 / 8	16 / 4	1,125 <sup>I</sup>	0,25 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
CEMM 05-3-088	64	32	128	8	32 / 16	16 / 32	16 / 2	1 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
<i>Sporothrix globosa</i>										
CEMM 05-4-004	512	64	32	16	256 / 64	128 / 8	128 / 4	1,5 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-005	256	4	32	16	64 / 2	64 / 8	64 / 4	0,75 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-006	256	16	64	8	128 / 16	64 / 32	64 / 1	1,5 <sup>I</sup>	0,75 <sup>I</sup>	0,375 <sup>S</sup>
<i>Sporothrix mexicana</i>										
CEMM 05-3-101	256	32	32	16	64 / 32	64 / 32	64 / 4	1,25 <sup>I</sup>	1,25 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-008	512	16	32	8	256 / 8	128 / 8	64 / 2	1 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-009	512	32	128	32	256 / 16	256 / 64	128 / 8	1 <sup>I</sup>	1,0 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>
<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i>										
CEMM 05-3-090	64	8	64	16	128 / 4	16 / 16	8 / 4	2,5 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
CEMM 05-3-048	32	8	64	16	16 / 16	4 / 8	8 / 2	2,5 <sup>I</sup>	0,25 <sup>S</sup>	0,375 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-002	64	16	64	8	32 / 16	16 / 16	16 / 2	1,5 <sup>I</sup>	0,5 <sup>S</sup>	0,5 <sup>S</sup>

CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica. T-OH: Terpinen-4-ol. AMB: Anfotericina B. ITC: Itraconazol. TRB: Terbinafina. <sup>S</sup>: Sinergismo. <sup>I</sup>: Indiferença.

Nas combinações de T-OH com os antifúngicos frente aos biofilmes da forma filamentosa e leveduriforme de *Sporothrix* spp., obteve-se sinergismo na combinação com ITC para 9/12 cepas testadas, com indiferença apenas em uma cepa de *S. globosa* e duas cepas de *S. mexicana*. Nas combinações com TRB houve sinergismo com todas as cepas avaliadas. Não foi detectada interação nas combinações com AMB, assim como não foi encontrado antagonismos em nenhuma combinação com os antifúngicos.

## 2ª PARTE EXPERIMENTAL

### 6.7. Efeito de MQSs em células planctônicas

As CIM das moléculas de *quorum sensing* para as células planctônicas da forma filamentosa e leveduriforme de *Sporothrix* spp. estão apresentadas na tabela 7.

**Tabela 7** - Concentração inibitória mínima de moléculas de *quorum sensing* exógenas em células planctônicas de *Sporothrix* spp., nas formas filamentosa e leveduriforme.

Espécie	Concentração Inibitória Mínima					
	Farnesol ( $\mu$ M)		2-feniletanol (mM)		Tirosol (mM)	
	FF	FL	FF	FL	FF	FL
<i>Sporothrix brasiliensis</i>						
CEMM 05-3-052	0,0625	0,03125	2	2	1	0,5
CEMM 05-3-075	0,0625	0,03125	4	1	2	0,5
CEMM 05-3-078	0,125	0,03125	8	2	8	2
CEMM 05-3-087	0,125	0,0625	2	0,5	4	1
CEMM 05-3-088	0,125	0,03125	1	1	8	2
CEMM 05-3-089	0,0625	0,0625	1	1	8	4
<i>Sporothrix globosa</i>						
CEMM 05-4-004	0,03125	0,03125	0,5	0,5	4	2
CEMM 05-4-005	0,0625	0,03125	2	2	2	1
CEMM 05-4-006	0,25	0,0625	8	1	4	2
<i>Sporothrix mexicana</i>						
CEMM 05-3-101	1	0,125	1	1	4	2
CEMM 05-4-008	0,01563	0,03125	4	2	1	1
CEMM 05-4-009	0,5	0,125	4	1	4	1
<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i>						
CEMM 05-3-090	0,125	0,0625	2	1	8	4
CEMM 05-3-048	1	0,125	1	1	2	2
CEMM 05-4-002	0,125	0,0625	4	2	4	1

CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica. FF: Forma filamentosa de *Sporothrix* spp. FL: Forma leveduriforme de *Sporothrix* spp.

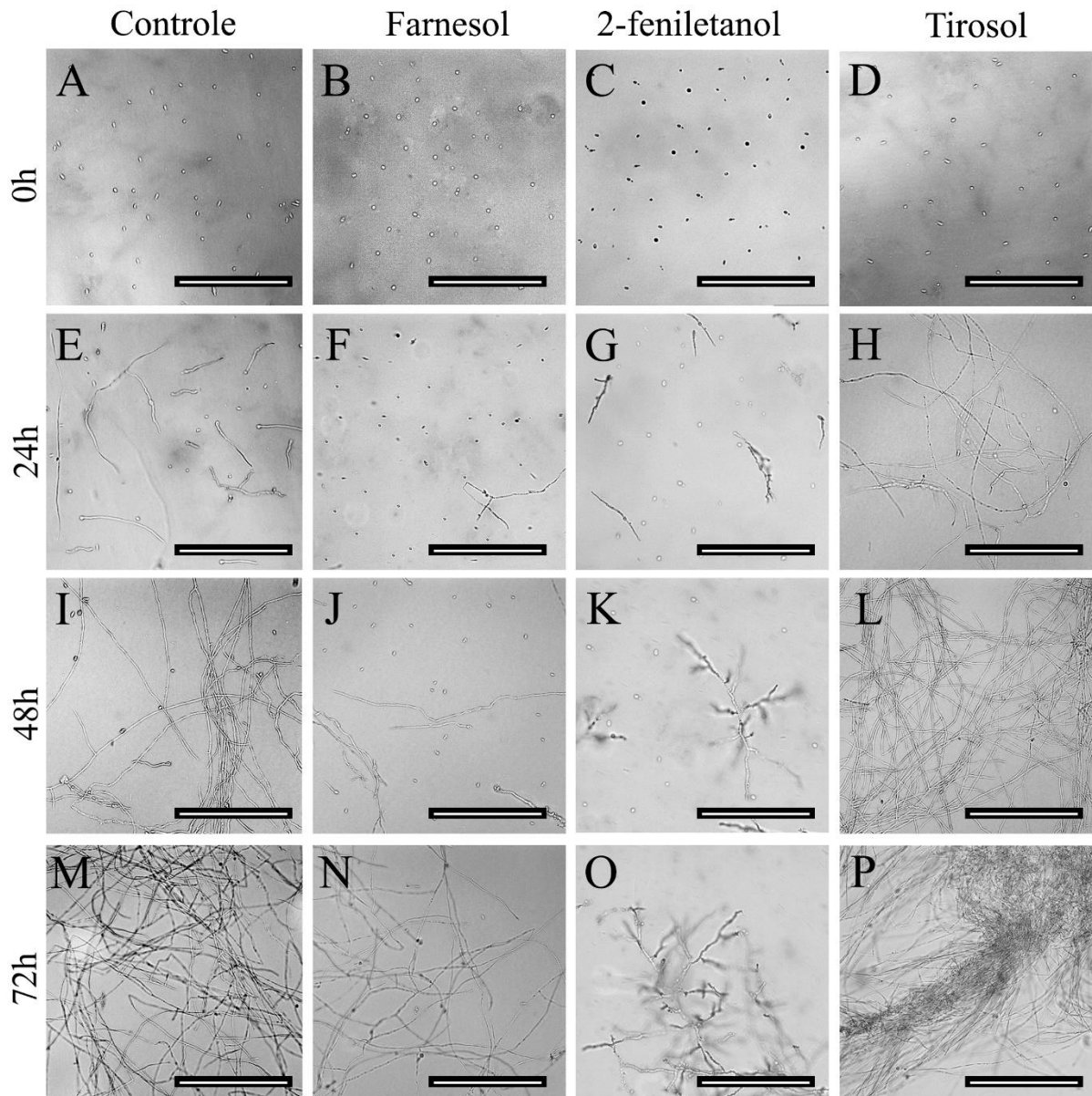
As moléculas *quorum sensing* mostraram valores de MIC variando de 0,01 a 1  $\mu\text{M}$  para farnesol; de 1 a 8 mM para 2-feniletanol e tirosol, para a forma filamentosa de *Sporothrix* spp. Valores mais baixos foram observados contra a forma leveduriforme de *Sporothrix* spp., com CIMs variando de 0,03 a 0,125  $\mu\text{M}$  para farnesol; 0,5 a 2 mM para 2-feniletanol; e 0,5 a 4 mM para tirosol. O triptofol mostrou CIM maior do que 16 mM contra ambas as formas de *Sporothrix*. Nenhuma diferença significativa nos valores de CIM foi observada entre as espécies de *Sporothrix*.

Para os antifúngicos clássicos, os valores de CIM frente a forma filamentosa de *Sporothrix* spp., variaram de 0,25 a 4  $\mu\text{g/ml}$  para anfotericina B; de 0,25 a 4  $\mu\text{g/ml}$  para itraconazol e de 0,03 a 0,25  $\mu\text{g/ml}$  para terbinafina, enquanto para a forma leveduriforme a variação foi de 0,03 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$  para anfotericina B, 0,03 a 1  $\mu\text{g/ml}$  para itraconazol e 0,03 a 0,13  $\mu\text{g/ml}$  para a terbinafina.

#### **6.8. Efeito de MQSs na filamentação de *Sporothrix* spp.**

Os efeitos dos QSMs na filamentação de *Sporothrix* spp. podem ser vistos na Figura 13. Farnesol e 2-feniletanol foram capazes de reduzir/retardar a filamentação de *Sporothrix* em comparação com a filamentação observada no controle sem drogas. Em contraste, o tirosol estimulou a filamentação das células em comparação com o controle sem drogas.

**Figura 13** - Efeito de moléculas de *quorum sensing* na filamentação de *Sporothrix* spp.



As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (A, E, I e M), RPMI 1640 suplementado com farnesol 0,031  $\mu\text{M}$  (B, F, J e N), 2-feniletanol 0,5 mM (C, G, K e O) e 1 mM tirosol (D, H, L e P), com incubação por 0 h (A - D), 24 h (E - H), 48 h (I - L) e 72 h (M - P). Escala: 100  $\mu\text{m}$ . As imagens foram obtidas em microscópio óptico com objetiva de 40  $\times$ .

### 6.9. Efeito de MQSs na etapa de formação de biofilme

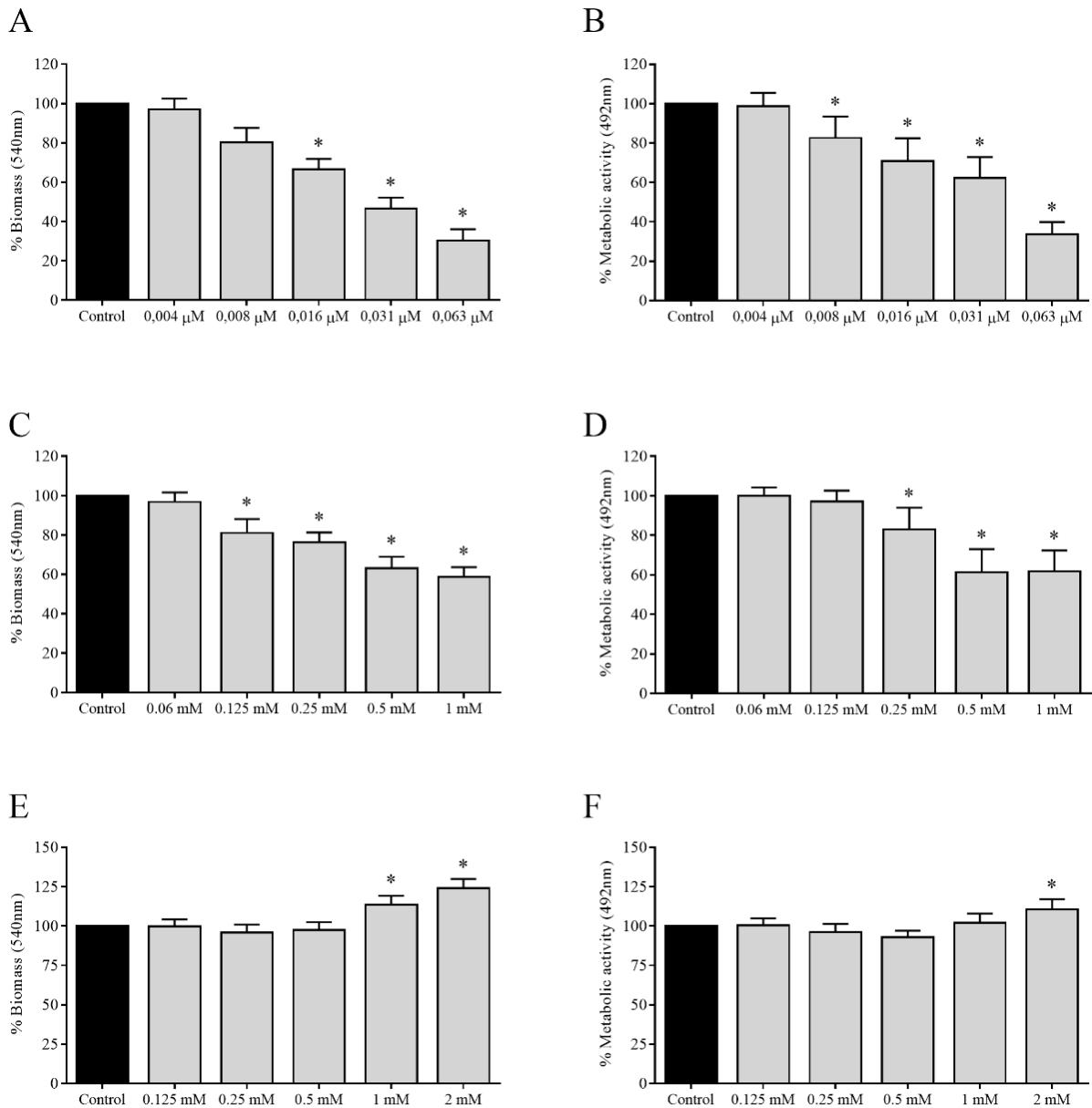
Com relação ao efeito das moléculas de *quorum sensing* durante o processo de formação dos biofilmes de *Sporothrix* spp. na forma filamentosa (Figura 14) e leveduriforme (Figura 15), observou-se perfis de resposta diferentes para cada composto.



A adição de FAR durante a formação de biofilme de *Sporothrix* spp. na forma filamentosa (Figura 14A e 14B) reduziu a produção de biomassa e atividade metabólica a partir da concentração de 0,008  $\mu$ M, atingindo uma inibição máxima de 70% na biomassa e 66% na atividade metabólica na concentração de 0,063  $\mu$ M ( $p < 0,05$ ). A adição de 2-feniletanol reduziu a produção de biomassa e atividade metabólica (Figura 14C e 14D) a partir da concentração de 0,125 mM, com reduções máximas de 49% na biomassa e 38% na atividade metabólica na concentração de 1 mM ( $p < 0,05$ ). O tirosol teve o efeito oposto (Figura 14E e 14F), aumentando a produção de biomassa em 24% e a atividade metabólica em 10% nos biofilmes da forma filamentosa de *Sporothrix* spp. tratados com 2 mM da droga ( $p < 0,05$ ). O triptofol não alterou a produção de biomassa e a atividade metabólica do biofilme de *Sporothrix* spp. em forma filamentosa.

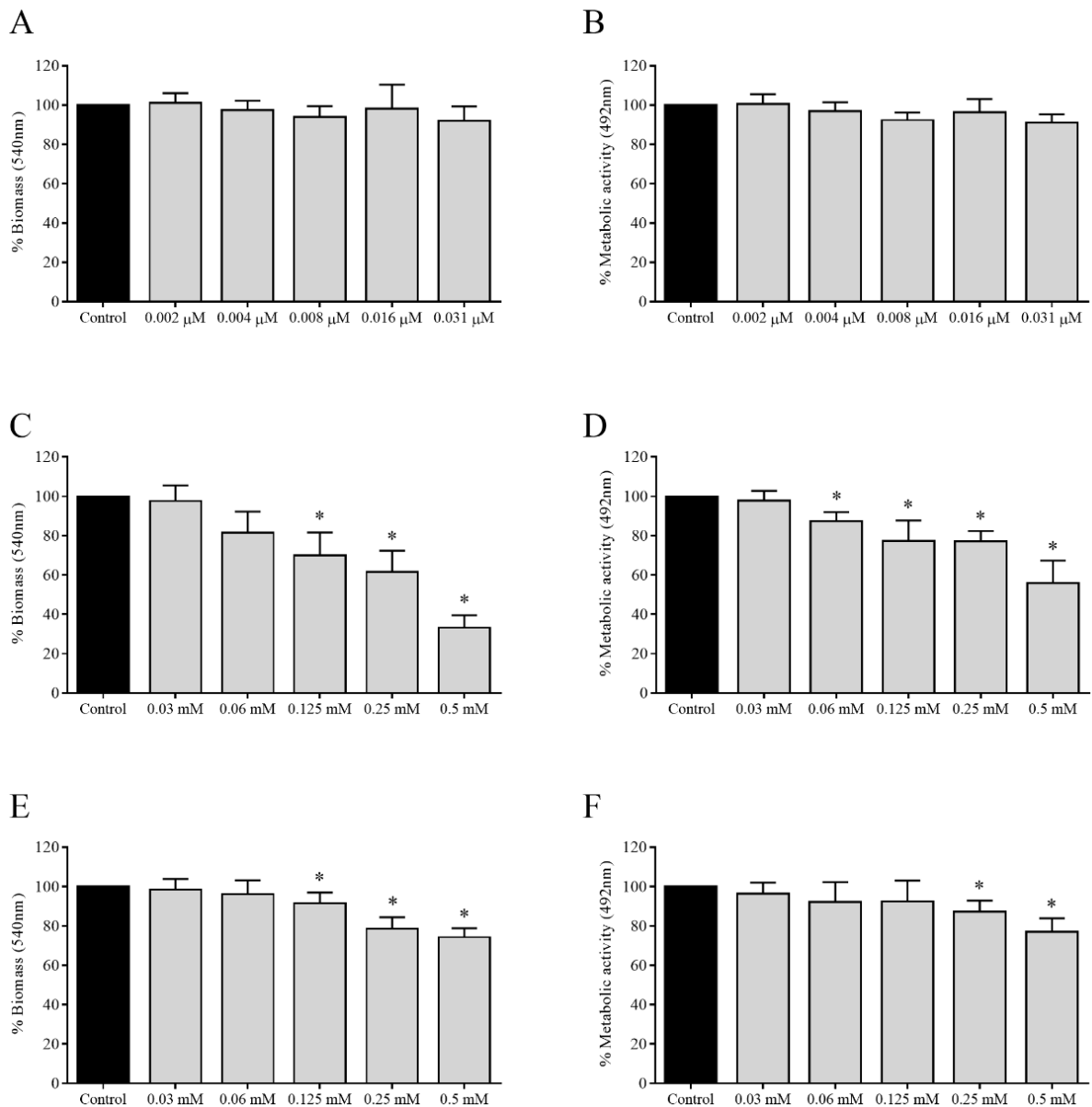
Quanto aos efeitos das moléculas nos biofilmes de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme (Figura 15), diferente do observado na forma filamentosa, a adição de FAR não alterou a formação de biofilme. Quanto a adição de F-OH foi observado que assim como nos biofilmes da forma filamentosa, o F-OH reduziu a biomassa e a atividade metabólica dos biofilmes em 19% e 13%, respectivamente (Figura 15C e 15D), na concentração de 0,06 mM ( $p < 0,05$ ), causando reduções de 47% e 45% em biomassa e atividade metabólica, respectivamente, a 0,5 mM ( $p < 0,05$ ). Nos biofilmes leveduriformes não foram observados estímulos na produção de biofilme por parte do TIR, ao contrário, foram observadas reduções (Figura 15E e 15F) de 36% na biomassa e 33% na atividade metabólica na concentração de 0,5 mM ( $p < 0,05$ ). Nessa apresentação morfológica a adição de FAR não gerou redução ou estímulos na produção de biofilme. O triptofol não alterou a produção de biomassa e a atividade metabólica do biofilme de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme (dados não mostrados).

**Figura 14** - Efeito de moléculas de *quorum sensing* na formação de biofilme de *Sporothrix* spp. na forma filamentososa.



Quantificação de biomassa (A, C e E) e atividade metabólica (B, D e F) de biofilmes formados na presença de farnesol (A e B), 2-feniletanol (C e D) e tirosol (E e F). Barras pretas correspondem aos biofilmes formados em meio RPMI 1640 sem droga (controle). Barras cinza representam os biofilmes tratados com diferentes concentrações dos compostos. Resultados expressos por média  $\pm$  desvio padrão de porcentagem relativa.

**Figura 15** - Efeito de moléculas de *quorum sensing* na formação de biofilme de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme.



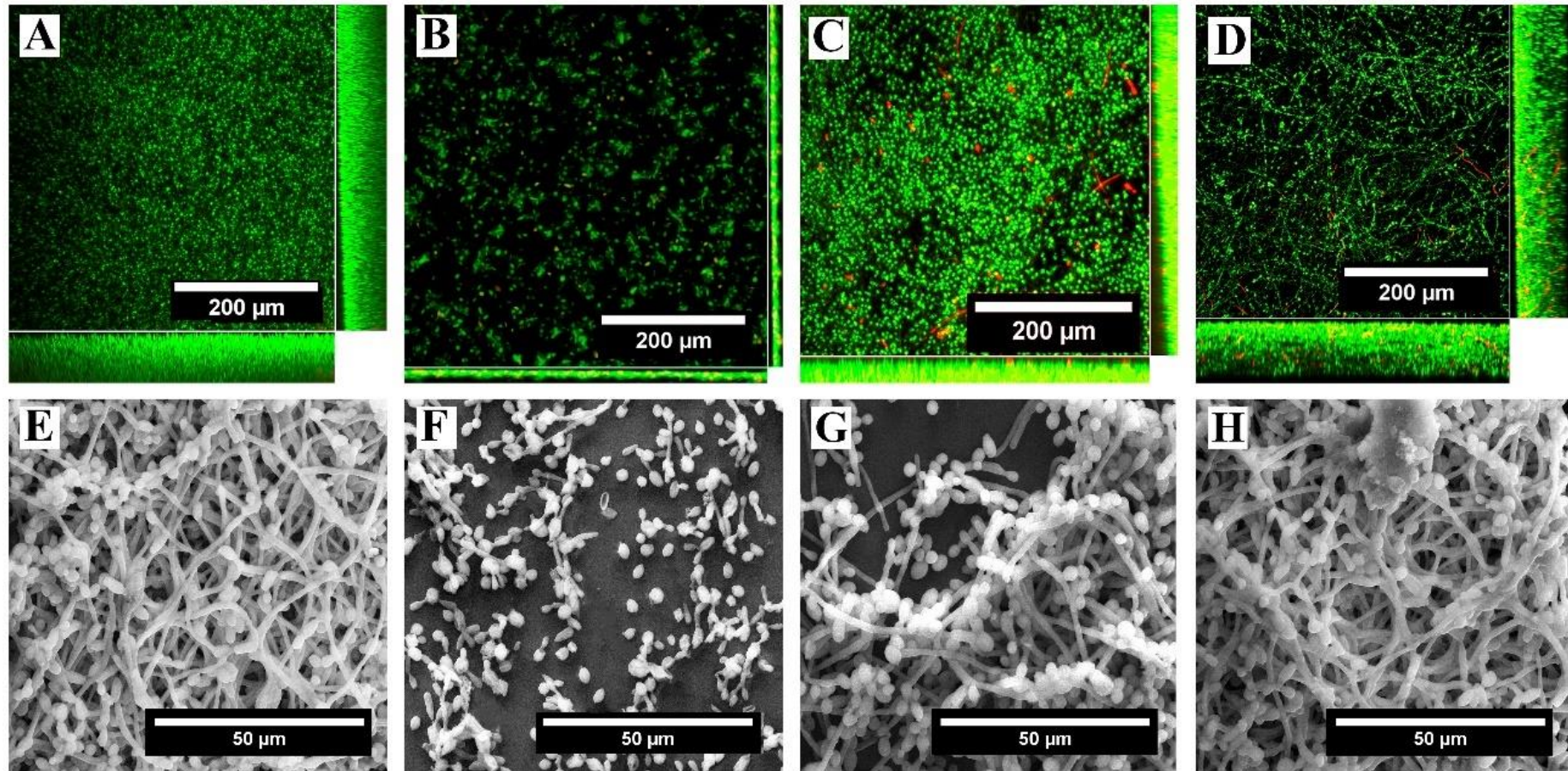
Quantificação de biomassa (A, C e E) e atividade metabólica (B, D e F) de biofilmes formados na presença de farnesol (A e B), 2-feniletanol (C e D) e tirosol (E e F). Barras pretas correspondem aos biofilmes formados em meio RPMI 1640 sem droga (controle). Barras cinza representam os biofilmes tratados com diferentes concentrações dos compostos. Resultados expressos por média  $\pm$  desvio padrão de porcentagem relativa.

Para complementar a análise das MQSs, imagens de microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura foram adquiridas das condições que houve maior redução ou estimulação dos biofilmes filamentosos (Figura 16) e leveduriformes (Figura 17).

As micrografias (Figura 16) mostraram que os biofilmes filamentosos formados na presença de FAR apresentaram uma redução considerável na densidade celular e no número de filamentos (Figura 16B e 16F), bem como uma redução de 72% na espessura do biofilme. O F-OH também causou uma redução na densidade populacional no biofilme, sem uma redução nos filamentos (Figura 16G), além de reduzir a espessura do biofilme em 53% (Figura 16C). Um efeito diferente foi observado nos biofilmes formados na presença de TIR, onde foi observado um aumento de 24% na espessura (Figura 16D), juntamente com mais filamentos do que o observado no controle (Figura 16A).

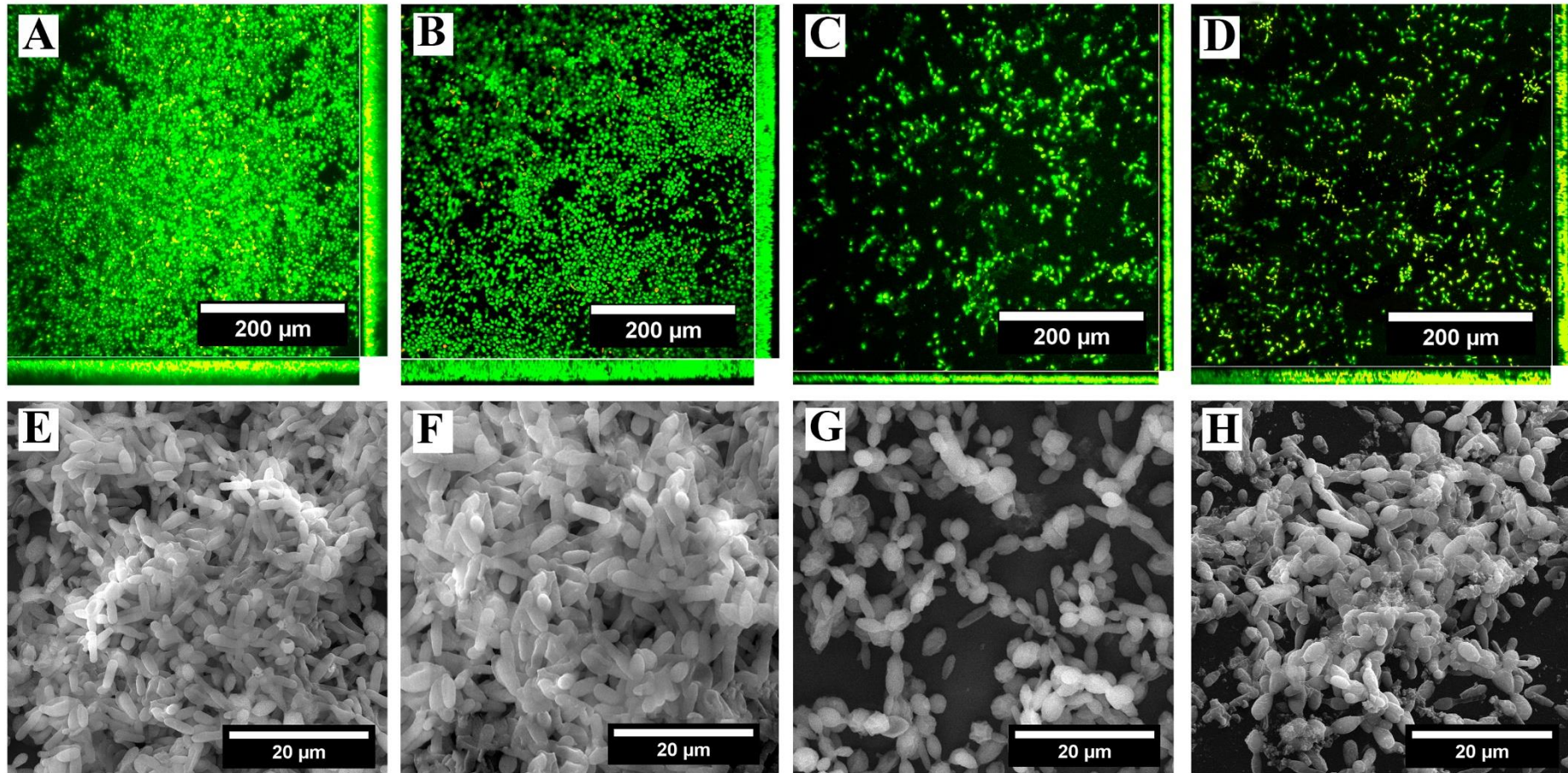
As micrografias obtidas dos biofilmes de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme (Figura 17) demonstraram que o F-OH causou uma redução na densidade populacional (Figura 17C e 17G) e diminuiu a espessura do biofilme em 61% (Figura 17C) em comparação com o controle (Figura 17A). Um efeito semelhante foi observado para TIR (Figura 17D e 17H), com redução de 61% na espessura do biofilme.

**Figura 16** - Micrografias de biofilmes de *Sporothrix* sp., na forma filamentosa, formados na presença de moléculas de *quorum sensing*.



Microscopia confocal de varredura a laser (A - D) e microscopia eletrônica de varredura (E - H). A e E: Biofilmes formados sem exposição a droga. B e F: Biofilmes formados na presença de  $0,063 \mu\text{M}$  de farnesol. C e G: biofilmes formados na presença de  $1\text{mM}$  de 2-feniletanol. D e H: Biofilmes formados na presença de  $2 \text{mM}$  de tirosol. Magnitude:  $3.000 \times$  (E - H),  $400 \times$  (A - D). Escala:  $200 \mu\text{m}$  (A - D) e  $50 \mu\text{m}$  (E - H). Lasers:  $488 \text{nm}$  para detecção de SYTO9 e  $561 \text{nm}$  para detecção de iodeto de propídio.

**Figura 17** - Micrografias de biofilmes de *Sporothrix* sp., na forma leveduriforme, formados na presença de moléculas de *quorum sensing*.



Microscopia confocal de varredura a laser (A - D) e microscopia eletrônica de varredura (E - H). A e E: Biofilmes formados sem exposição a droga. B e F: Biofilmes formados na presença de 0,031  $\mu\text{M}$  de farnesol. C e G: Biofilmes formados na presença de 0,5 mM de 2-feniletanol. D e H: Biofilmes formados na presença de 0,5 mM de tirosol. Magnitude: 3.000  $\times$  (E - H), 400  $\times$  (A - D). Escala: 200  $\mu\text{m}$  (A - D) e 20  $\mu\text{m}$  (E - H). Lasers: 488 nm para detecção de SYTO9 e 561 nm para detecção de iodeto de propídio.

### 6.10. Sensibilidade de biofilmes de *Sporothrix* spp. às MQSs

Os valores de CIMB das MQSs para os biofilmes da forma filamentosa e leveduriforme de *Sporothrix* spp. estão listados na tabela 8. Para biofilmes filamentosos, os valores médios de CIMB<sub>50</sub> de FAR foram de 20,16 µM para *S. brasiliensis*, 16 µM para *S. globosa*, 10,08 µM para *S. mexicana* e 12,7 µM para *S. schenckii* s. str. Valores semelhante foram observados com F-OH, sendo 12,7 mM para *S. brasiliensis*, 10,08 mM para *S. globosa*, 16 mM para *S. mexicana* e 12,7 mM para *S. schenckii* s. str. Já para os dados obtidos com TIR percebe-se valores mais elevados com CIMB<sub>50</sub> de 80,63 mM para *S. brasiliensis*, 101,59 mM para *S. globosa*, 64 mM para *S. mexicana* e 80,63 mM para *S. schenckii* s. str. Não foi observada inibição por parte do TRP.

**Tabela 8** - Concentração inibitória mínima em biofilme de moléculas de *quorum sensing* exógenas frente biofilmes de *Sporothrix* spp., nas formas filamentosa e leveduriforme.

Espécie	Concentração Inibitória Mínima em Biofilme					
	Farnesol (µM)		2-feniletanol (mM)		Tirosol (mM)	
	FF	FL	FF	FL	FF	FL
<i>Sporothrix brasiliensis</i>						
CEMM 05-3-052	8	8	16	4	128	64
CEMM 05-3-075	32	4	16	8	128	32
CEMM 05-3-078	16	4	16	16	64	128
CEMM 05-3-087	32	8	8	4	64	64
CEMM 05-3-088	16	2	8	8	64	128
CEMM 05-3-089	32	1	16	16	64	64
<i>Sporothrix globosa</i>						
CEMM 05-4-004	8	2	8	8	64	128
CEMM 05-4-005	16	4	8	8	128	64
CEMM 05-4-006	32	2	16	16	128	128
<i>Sporothrix mexicana</i>						
CEMM 05-3-101	16	1	16	16	64	32
CEMM 05-4-008	8	16	32	4	64	64
CEMM 05-4-009	8	8	8	16	64	64
<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i>						
CEMM 05-3-090	16	2	32	16	64	32
CEMM 05-3-048	8	4	8	8	128	128
CEMM 05-4-002	16	4	8	4	64	64

CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica. FF: Forma filamentosa de *Sporothrix* spp. FL: Forma leveduriforme de *Sporothrix* spp.

Para biofilmes leveduriformes, os valores médios de CIMB<sub>50</sub> de FAR foram de 3,56 µM para *S. brasiliensis*, 2,52 µM para *S. globosa*, 5,04 µM para *S. mexicana* e 3,17 µM para *S. schenckii s. str.* Os valores observados com F-OH foram cerca de 3 vezes maiores, com CIMB<sub>50</sub> de 8 mM para *S. brasiliensis* e *S. schenckii s. str.* e 10,08 mM para *S. globosa* e *S. mexicana*. Já para os dados obtidos com TIR percebe-se valores mais elevados com CIMB<sub>50</sub> de 71,84 mM para *S. brasiliensis*, 101,59 mM para *S. globosa*, 50,8 mM para *S. mexicana* e 64 mM para *S. schenckii s. str.* TRP também não apresentou atividade inibitória nos biofilmes leveduriformes de *Sporothrix spp.*

### **3ª PARTE EXPERIMENTAL**

#### **6.11. Escolha do *software* de acoplamento**

Em uma terceira etapa deste estudo, trabalhamos no desenvolvimento de um software em formato de *plugin* em linguagem Java, denominado como “QuantyFilm”, destinado a análise da fluorescência de imagens adquiridas por microscopia confocal de varredura a laser. Dentre as plataformas disponíveis que atenderam aos requisitos definidos anteriormente, estavam os *softwares* Fiji, MatLab e ImageJ. Destes escolhemos aquela que apresenta maior número de citações em trabalhos científicos, o programa de processamento de imagens ImageJ, desenvolvido por Wayne Rasband, do National Institute of Mental Health (NIMH) em Maryland, USA.

#### **6.12. Estrutura de funcionamento**

O sistema foi desenvolvido para realizar a quantificação da intensidade de fluorescência dos fluorocromos Syto9 e iodeto de propídio a fim de avaliar indiretamente a proporção de células viáveis e inviáveis presentes nos biofilmes.

O esquema de funcionamento da ferramenta é exemplificado na figura 18, seguindo:

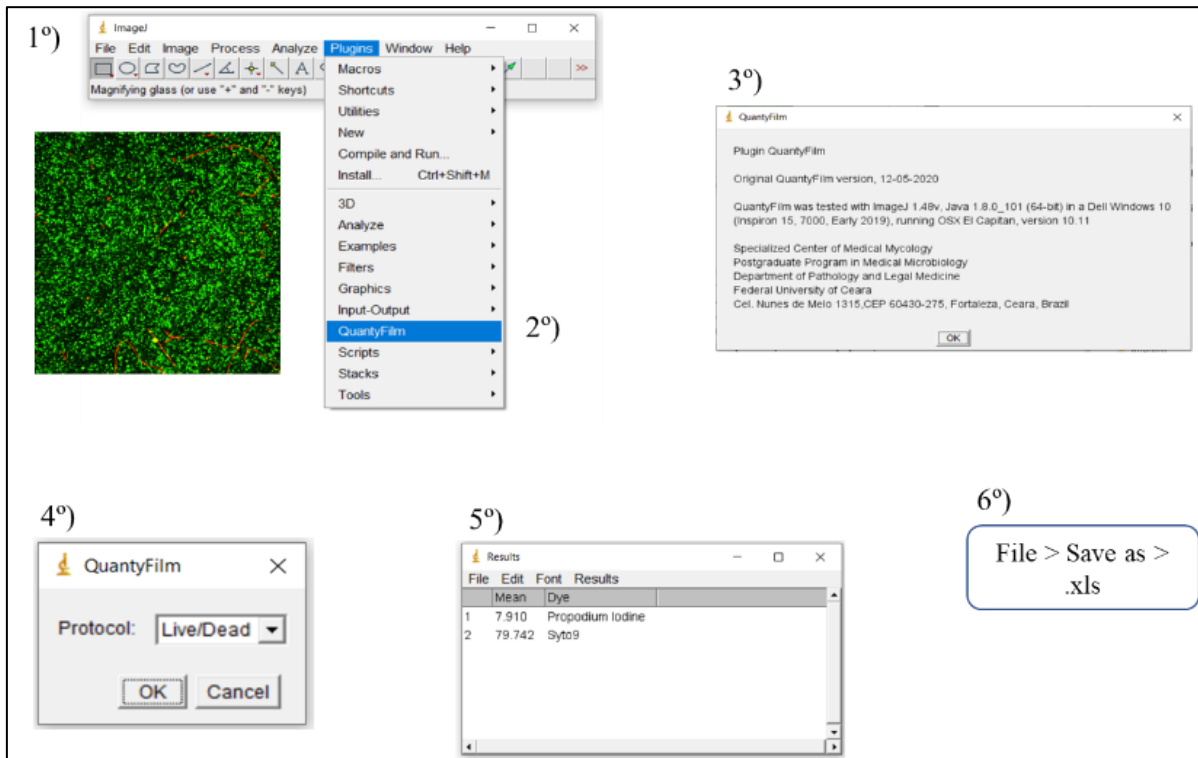
- 1º) Abertura do *software* ImageJ e da imagem a ser quantificada;
- 2º) Navegar pelo menu “*Plugins*” até a opção “*QuantyFilm*”;
- 3º) A ferramenta exibe os dados do desenvolvedor e da versão em utilização;
- 4º) A próxima janela aberta solicita a escolha do protocolo que se deseja utilizar para quantificação;



5º) Após varredura dos *Slices* do biofilme o sistema gera um média da fluorescência dos fluorocromos utilizados no referido protocolo;

6º) Uma vez gerado o resultado o usuário tem a opção de exportar o resultado em arquivo “.xls” para utilização em outras plataformas.

**Figura 18** - Esquema de funcionamento do plugin *QuantyFilm*.

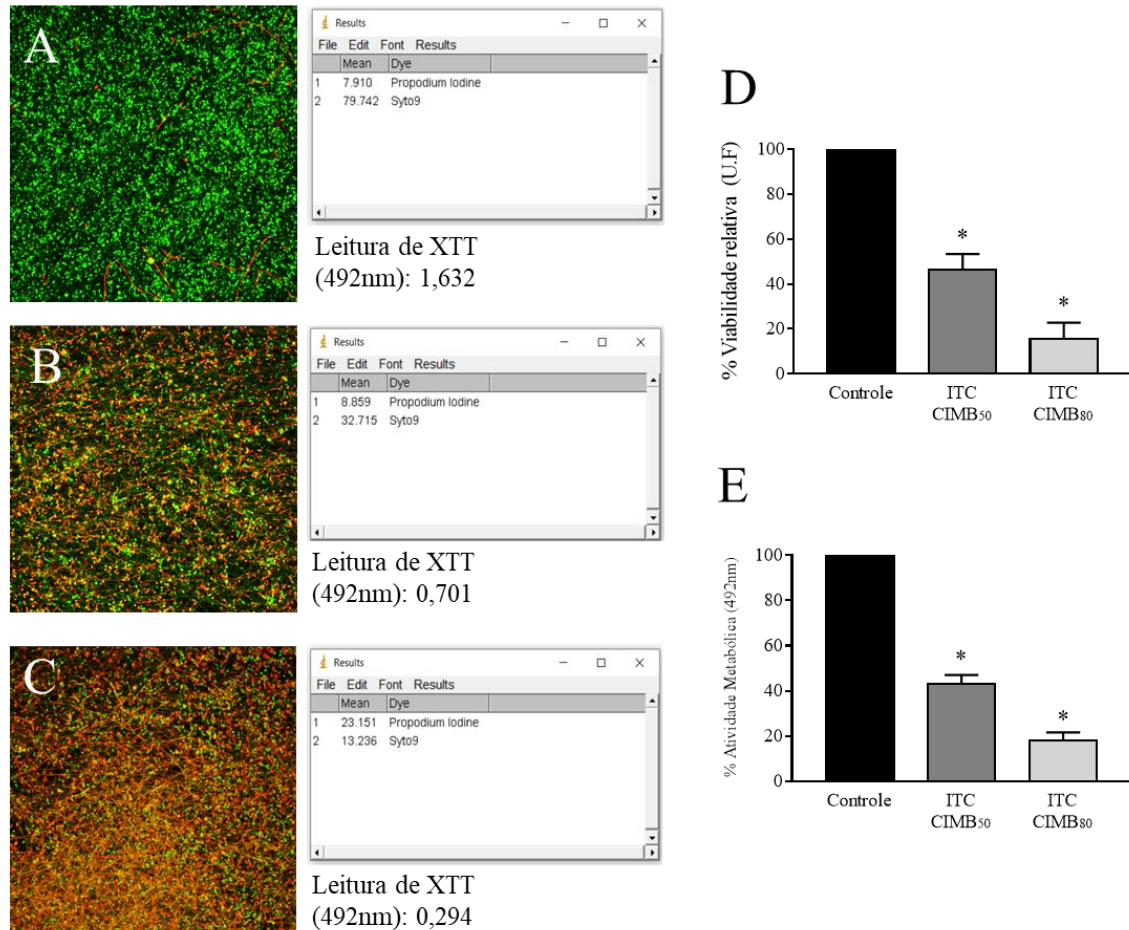


### 6.13. Quantificação de viabilidade celular por fluorescência

Uma vez adquiridos os resultados da quantificação da fluorescência dos corantes Syto9 e iodeto de propídio utilizando o sistema QuantyFilm, os dados foram transformados em porcentagem relativa utilizando os resultados do biofilme “controle” (livre de droga) como referência de 100%. A mesma conversão foi realizada com os dados de atividade metabólica quantificados por leitura XTT em espectrofotômetro a 492nm.

Os resultados mostraram que uma redução na viabilidade celular dos biofilmes de 53,7% no tratamento com a CIMB<sub>50</sub> de ITC e de 86,4% no tratamento com a CIMB<sub>80</sub> de ITC (Figura 19D). No ensaio de redução de XTT para avaliação da atividade metabólica, as reduções encontradas anteriormente para ensaios paralelos eram de 56,6% no tratamento com CIMB<sub>50</sub> de ITC e de 83,8% no tratamento com CIMB<sub>80</sub> de ITC (Figura 19E).

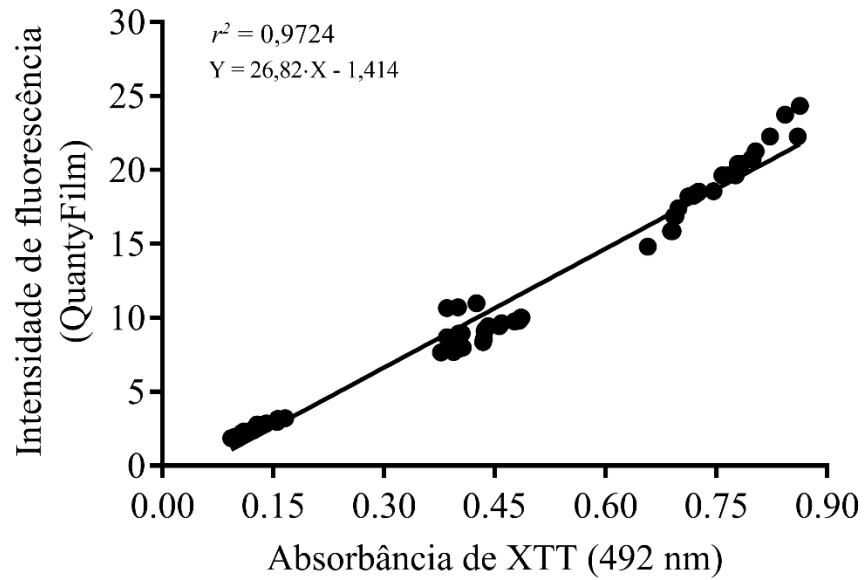
**Figura 19** – Análise de viabilidade celular e atividade metabólica de biofilmes de *Sporothrix brasiliensis*.



CIMB<sub>50</sub>: concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% da atividade metabólica dos biofilmes. CIMB<sub>80</sub>: concentração inibitória mínima capaz de inibir 80% da atividade metabólica dos biofilmes. ITC: Itraconazol. A: Biofilme não tratado. B: Biofilme tratado com a CIMB<sub>50</sub> de ITC. C: Biofilmes tratado com CIMB<sub>80</sub> de ITC. D: Resultado da quantificação (n = 27 imagens) de fluorescência de Syto9 pelo sistema QuanyFilm. E: Resultado da quantificação (n = 27 leituras) de atividade metabólica por ensaio de redução de XTT lido em espectrofotômetro a 492nm. Lasers: 488 nm para detecção de Syto9 (células viáveis em verde) e 561 nm para detecção de iodeto de propídeo (células mortas ou com dano de membrana em vermelho).

A correlação entre os dados obtidos pelas duas metodologias foi determinada pelo teste de analisada pelo teste de Pearson, obtendo-se um valor de  $r$  de 0,9824 (0,9724 - 0,9888), com  $p < 0,0001$ . A partir de uma análise de regressão linear, foi determinada a equação da reta como sendo  $Y = 26,82X - 1,414$  (Figura 20).

**Figura 20** – Análise de correlação entre intensidade de fluorescência de Syto9 obtida pelo método QuantyFilm e absorvância mensurada no ensaio de redução de XTT.



Cada ponto de dados é composto por dois parâmetros: os valores do eixo X correspondem absorvância da leitura do ensaio de redução de XTT e os valores do eixo Y representam o valor médio da intensidade de fluorescência obtida por QuantyFilm nas mesmas condições.

## 7 DISCUSSÃO

O T-OH é um monoterpeneo que possui atividade antimicrobiana relatada em estudos *in vitro* e *in vivo* (MARTÍNEZ et al., 2014; NINOMIYA et al., 2012). Os efeitos antifúngicos de T-OH foram anteriormente descritos por Tonon et al. (2018) frente espécies de *Candida* (CIM: 4.530 µg/ml). Ademais estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que T-OH possui atividade antifúngica frente as formas filamentosas (MIC: 20 a 1.420 µg/ml) e leveduriformes (MIC: 40 a 350 µg/ml) de *H. capsulatum* (BRILHANTE et al., 2016) e a forma filamentososa de *C. posadasii* (MIC: 350 a 1420 µg/ml) (BRILHANTE et al., 2016) e *Sporothrix* spp. (MIC: 87,9 a 1429,8 µg/ml) (BRILHANTE et al., 2015b). Em sequência as informações descritas nos trabalhos supracitados, trazemos no presente estudo a avaliação da atividade antifúngica de T-OH e seus efeitos sobre o teor de ergosterol em células planctônicas leveduriformes de *Sporothrix* spp., seu potencial antifúngico frente biofilmes formados das formas filamentososa e leveduriforme de *Sporothrix* spp. e suas interações com as drogas antifúngicas utilizadas no tratamento da esporotricose.

A atividade antifúngica de T-OH frente as células planctônicas leveduriformes de *Sporothrix* spp. foi observada com CIM variando de 4 a 32 µg/ml. Em estudos anteriores (BRILHANTE et al., 2015b) determinamos as CIM de T-OH para a forma filamentososa de *Sporothrix* spp. com valores de 87,9 a 1.429,8 µg/ml. Essa variação na sensibilidade das diferentes morfologias de *Sporothrix* spp. pode ocorrer por diferenças nas proporções dos constituintes da parede celular do fungo, como glicosamina e β-1,3-glucano (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2017).

Embora o mecanismo de ação do T-OH sobre células fúngicas ainda não tenha sido esclarecido, alguns autores indicam que terpenos como o T-OH, podem atuar interferindo na biossíntese de ergosterol celular (BRILHANTE et al., 2016). Nesse estudo avaliou-se as alterações no teor de ergosterol celular da forma leveduriforme de *Sporothrix* spp., após a exposição às concentrações sub-inibitórias de T-OH. Os resultados obtidos mostram a redução de até 73% no teor de ergosterol das células tratadas com esse terpeno. Esse resultado foi semelhante ao observado para itraconazol. O ergosterol é o esterol encontrada de forma predominante nas células fúngicas, sendo responsável por regular a fluidez e permeabilidade da membrana. Estudos relatam que monoterpeneos, como o T-OH, possuem uma característica lipofílica, e por isso apresentam ação direta sobre a estrutura da membrana celular (HAMMER; CARSON; RILEY, 2004; MARCOS-ARIAS et al., 2011; PARVEEN et al., 2004).

Baseando-se no biofilme como sendo um fator de resiliência para a sobrevivência dos microrganismos, investigou-se a atividade antifúngica do T-OH contra os biofilmes de *Sporothrix* spp., nas suas formas filamentosa e leveduriforme. Tanto para os biofilmes da forma filamentosa quanto para a forma leveduriforme de *Sporothrix* spp. as espécies *S. brasiliensis* e *S. schenckii* s. str. apresentaram-se mais responsivas ao T-OH, quando comparadas à *S. globosa* e *S. mexicana*. Ademais, observamos uma melhor atividade do T-OH frente aos biofilmes da forma leveduriforme de *Sporothrix* spp., quando comparada aos biofilmes da forma filamentosa. Para a forma filamentosa de *Sporothrix* spp., os valores de CIMB<sub>80</sub> de T-OH foram em média 40 vezes maiores que os valores de inibição para células planctônicas, enquanto para a forma leveduriforme essa diferença foi cerca de 20 vezes maiores, demonstrando um aumento na tolerância a este fármaco quando o fungo está na forma de biofilme.

A elevada tolerância dos biofilmes pode estar relacionada a várias características observadas nos biofilmes, como superexpressão de bombas de efluxo, alterações na fisiologia geral da célula, alta densidade celular e presença de matriz extracelular (RAMAGE et al., 2012). As diferenças observadas na tolerância dos biofilmes das apresentações filamentosa e leveduriforme desses fungos podem ter ocorrido por diferenças na intensidade de formação de biofilme, uma vez que a forma filamentosa forma biofilmes mais robustos e com biomassa superior a forma leveduriforme (BRILHANTE et al., 2018b; SILVA, 2017).

Embora sejam escassos os trabalhos que avaliaram a atividade de T-OH em biofilmes de fungos, Tonon et al. (2018) relataram a inibição de biofilmes de *Candida* spp. em concentrações de 2031 µg/ml. Também foi demonstrado que nanopartículas de T-OH possuem potencial antifúngico contra o biofilme de *C. albicans* (SUN; ZHANG; LI, 2012). Ademais, Bucci et al. (2018) relataram que micelas contendo T-OH possuíam atividade antiaderente, causando a desagregação de células de *Candida* spp. previamente aderidas à superfícies, desestruturando assim os biofilmes previamente formados.

Quando combinado com os antifúngicos o T-OH apresentou sinergismo com itraconazol e terbinafina e indiferenças nas combinações com anfotericina B. Considerando que o mecanismo de ação do T-OH não é totalmente compreendido, é difícil explicar o sinergismo observado com os agentes antifúngicos, uma vez que este pode atuar em mais de um alvo. Alguns mecanismos têm sido propostos para a atividade antimicrobiana dos terpenos. Por exemplo, Oyedemi *et al.* e Zengin and Baysal mostraram que um composto químico semelhante,  $\alpha$ -terpineol, inibiu várias cepas de bactérias gram positivas e gram negativas por

desestabilização das membranas celulares. Além disso, a interação com alvos intracelulares também é sugerida (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Neste estudo, demonstramos que o T-OH reduz o conteúdo de ergosterol em *Sporothrix* spp. Considerando a ação do itraconazol para inibir a 14- $\alpha$ -desmetilase e a terbinafina para inibir a esqualeno epoxidase, ambas envolvidas na biossíntese do ergosterol (PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016), e o efeito do T-OH para reduzir o conteúdo de ergosterol observado neste estudo, hipotetizamos que este composto também pode inibir enzimas relacionadas com a síntese de ergosterol. Dessa forma, sua combinação com itraconazol e terbinafina poderia estar causando a inibição de diferentes pontos da cascata de biossíntese do ergosterol, justificando assim o sinergismo observado entre essas drogas (JOHNSON et al., 2004).

As combinações de T-OH com anfotericina B apresentaram resultados indiferentes. Outros estudos avaliando a combinação de anfotericina B com drogas que atuam na biossíntese de ergosterol também encontraram resultados indiferentes (KALKANCI et al., 2010; LI et al., 2010; SANTOS et al., 2012). Embora não haja uma explicação clara para esse resultado, algumas hipóteses podem ser traçadas com base nos mecanismos de ação dessas drogas. Classicamente, o mecanismo de ação da anfotericina B é descrito como a formação de poros na membrana celular após a ligação ao ergosterol (MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012; PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016), o que teoricamente poderia gerar antagonismo quando esta droga é combinada com outras que atuam reduzindo a produção de sua molécula alvo. Entretanto, tem sido descrito que a formação de poros na membrana não é a única forma pela qual a anfotericina B exerce sua atividade, atuando também pela indução de dano oxidativo na célula (MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012). A presença desse segundo mecanismo de ação, por indução do estresse oxidativo, que independe da ligação ao ergosterol, poderia explicar, pelo menos em parte, por que a combinação da anfotericina B e T-OH não gerou resultados antagônicos, mas sim resultados indiferentes.

Em estudos anteriores que avaliaram a absorção e distribuição cutânea de terpenos, foi relatado que o T-OH tem penetração cutânea rápida e progressiva após a aplicação tópica (CAL; KUPIEC; SZNITOWSKA, 2006). Considerando que aproximadamente 95% dos casos de esporotricose apresentam as formas cutânea localizada e linfocutânea da doença, caracterizada pelo aparecimento de lesões cutâneas nodulares (OROFINO-COSTA et al., 2017), o T-OH pode se tornar um composto interessante para o estudo e desenvolvimento de formulações tópicas para fins terapêuticos.

Ao longo deste estudos também foi avaliado os efeitos de quatro MQSs (farnesol, tirosol, 2-feniletanol e triptofol). Os efeitos do QSM são descritos principalmente na morfogênese (transição da forma esférica para hifas), início da morte celular programada, apoptose e patogenicidade. Em comunidades de biofilme, QSM pode afetar o biofilme (fase de adesão, proliferação, filamentação, maturação e dispersão), regulação da morfologia celular e densidade populacional (RODRIGUES; ČERNÁKOVÁ, 2020).

Nos testes de sensibilidade com células planctônicas, o farnesol apresentou atividade antifúngica em ambas as formas, filamentosas e de leveduriforme, de *Sporothrix* spp. Os valores de CIM do farnesol foram inferiores aos obtidos em outros estudos, como com *Aspergillus fumigatus*, em que a CIM foi superior a 32.000  $\mu\text{M}$  (WONGSUK; LUPLERTLOP; SUKPHOPETCH, 2020), e *Candida albicans*, onde o farnesol apresentou CIM de 56,25  $\mu\text{M}$  (CORDEIRO et al., 2013). Nossos resultados todavia, são semelhantes aos observados para outros fungos dimórficos, nos quais o farnesol apresentou CIM de 0,285  $\mu\text{M}$  contra *C. posadasii* (BRILHANTE et al., 2013) e 0,01  $\mu\text{M}$  para *H. capsulatum* (BRILHANTE et al., 2015a). O mecanismo de ação do farnesol em células eucariontes está liado a inibição da biossíntese do colesterol (DELMONDES et al., 2019) e alguns autores sugerem que o efeito antifúngico do farnesol está ligado a inibindo a síntese de ergosterol, causando alterações na membrana celular (BRILHANTE et al., 2013; POLKE et al., 2018). Todavia a indução de apoptose também já foi apontada como um dos métodos pelos quais farnesol exerce seu efeito antimicrobiano (WANG et al., 2014).

Assim como o farnesol, o 2-feniletanol também apresentou atividade antifúngica contra as formas filamentosa e leveduriforme de *Sporothrix* spp. O efeito antimicrobiano do 2-feniletanol foi relatado anteriormente contra *C. albicans*, *Candida dubliniensis*, *S. cerevisiae*, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp. (FINDRI-GUŠTEK et al., 2012; HAN et al., 2013; LIU et al., 2014). Estudos indicam que o efeito inibitório do 2-feniletanol está relacionado à inibição da síntese de RNA, DNA e proteínas, ou mesmo causando danos de membrana e metabolismo celular (JIN et al., 2018; LIU et al., 2014). Assim, o 2-feniletanol poderia estar interferir na síntese de proteína ou causando danos de membrana em células de *Sporothrix* spp.

A terceira molécula de *quorum sensing* avaliado, o tirosol, já foi relatada em estudos anteriores, com CIM de 4,2 mM contra *Candida* spp. (JAKAB et al., 2019), CIM de 5,5 mM contra a forma filamentosa de *C. posadasii* (BRILHANTE et al., 2016), e CIM de 5,9 mM e 0,88 mM para células filamentosas e leveduriforme de *H. capsulatum*, respectivamente (BRILHANTE et al., 2016). Concentrações inibitórias semelhantes de tirosol foram observadas

contra *Sporothrix* spp. em ambas as formas filamentosas e de levedura. Um estudo baseado no perfil de expressão gênica de *C. albicans* mostrou que o tirosol afeta a regulação do ciclo celular, a replicação do DNA e a segregação cromossômica (JAKAB et al., 2019), podendo ser esse o mecanismos de ação contra as células de *Sporothrix* spp.

Em geral, as CIM para farnesol, 2-feniletanol e tirosol contra a forma leveduriforme de *Sporothrix* spp. foram 2 ou 4 vezes mais baixos do que os obtidos para a forma filamentosas. Essa diferença na suscetibilidade é comum e foi observada em vários estudos que avaliaram as duas apresentações morfológicas desse fungo (BRILHANTE et al., 2018a; GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2010; SANCHOTENE et al., 2017). Essa diferença pode estar relacionada à diferença nas proporções constituintes da parede celular fúngica entre as formas filamentosas e leveduriforme de *Sporothrix* spp., como glucosamina, glicose e  $\beta$ -1,3-glucana (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2017). A parede celular é uma estrutura importante para o crescimento de fungos, pois confere estabilidade osmótica e protege contra o estresse. Além disso, essa estrutura é responsável por manter a forma celular. Mudanças na estrutura da parede celular foram relacionadas à diminuição da suscetibilidade a AMB em *Candida* spp. (MESA-ARANGO et al., 2016). Assim, essas diferenças na composição da parede celular entre as formas filamentosas e leveduriforme de *Sporothrix* spp. poderiam influenciar o perfil de sensibilidade aos compostos.

As MQSs aqui estudados, foram descritos pela primeira vez em *C. albicans* (WONGSUK; PUMEESAT; LUPLERTLOP, 2016) e estão intimamente relacionados ao controle morfológico desse patógeno fúngico. No entanto, vários estudos já descreveram diferentes efeitos desses MQSs na morfologia, formação de biofilme e atividade antifúngica contra diferentes fungos (MEHMOOD et al., 2019), com efeitos dependentes das espécies fúngicas estudadas (SEBAA; BOUCHERIT-OTMANI; COURTOIS, 2019). Farnesol, tirosol, 2-feniletanol e triptofol são frequentemente estudados por seu importante papel na modulação do processo de filamentação e formação de biofilme. Neste estudo, investigamos os efeitos dessas quatro moléculas de *quorum sensing* exógenas na filamentação e formação de biofilme de *Sporothrix* spp. Nesses experimentos, optou-se por usar concentrações sub-inibitórias de MQSs para garantir que não houvesse inibição do crescimento celular.

A exposição ao farnesol causou uma redução na filamentação e formação de biofilme por *Sporothrix* spp. na forma filamentosas. Os biofilmes formados na presença desta MQS consistiam predominantemente de conídios e filamentos esparsos quando observados por microscopia confocal de varredura a laser, sem células danificadas observadas. No caso de biofilmes de levedura, nenhum efeito inibitório foi observado em concentrações sub-inibitórias



de farnesol. Estudos anteriores já demonstraram que o farnesol bloqueia a transição morfológica de levedura para hifa, evitando a formação de biofilme em *C. albicans* e *Trichosporon* spp. (CORDEIRO et al., 2019; HALL et al., 2011). A redução da filamentação também foi descrita em outros fungos dimórficos, como *Paracoccidioides* spp., reduzindo a formação de tubo germinativo em até 85%, sem afetar a viabilidade celular (DERENGOWSKI et al., 2009). Uma vez que a presença de múltiplas camadas de filamentos é uma marca registrada dos biofilmes filamentosos (HARDING et al., 2009), formulamos a hipótese de que a redução observada nos biofilmes de *Sporothrix* spp. se deve, em parte, à inibição da filamentação pelo farnesol.

O 2-feniletanol também causou inibição da filamentação e formação de biofilme por *Sporothrix* spp. A microscopia revelou que os biofilmes formados na presença de 2-feniletanol mantiveram sua integridade celular, conforme percebido pela ausência de células coradas com iodeto de propídio. 2-feniletanol é um MQS que inibe a formação de tubo germinativo e biofilme por *C. albicans* (CHEN; FINK, 2006). Estes efeitos de inibição do filamento podem explicar a atividade observada do 2-feniletanol em *Sporothrix* spp. Estudos anteriores também mostraram que várias vias celulares importantes são alteradas pelo tratamento com 2-feniletanol, incluindo aquelas de síntese de aminoácidos e proteínas, ciclo celular e morte celular, que se comunicam e trabalham colaborativamente na inibição fúngica (LIU et al., 2014; PU et al., 2014).

Ao contrário do farnesol e do 2-feniletanol, o tirosol causou um aumento na filamentação e na biomassa e atividade metabólica dos biofilmes filamentosos de *Sporothrix* spp. A microscopia confocal de varredura a laser revelou a formação de um biofilme mais espesso na presença de tirosol e um aumento dos filamentos, formando uma espessa malha de hifas. O tirosol estimula a formação de tubos germinativos, pseudo-hifas e biofilmes de *C. albicans* (ALEM et al., 2006). Este efeito parece ser dependente da concentração de tirosol utilizada, uma vez que Cordeiro et al. (2015) relataram que o tirosol exógeno adicionado no período de formação do biofilme de *C. albicans* foi capaz de reduzir significativamente a formação do biofilme, ao invés de estimular sua formação como indicado por Alem et al. (2006). Assim, o aumento do biofilme filamentosos de *Sporothrix* spp. pode ser devido à estimulação da produção de filamentos pelo tirosol.

Como a formação de biofilme é um fator de resiliência para a sobrevivência de microrganismos, investigamos a atividade antifúngica do farnesol, 2-feniletanol, tirosol e triptofol contra os biofilmes maduros de *Sporothrix* spp. Nesta etapa do estudo, passamos a utilizar concentrações variando de 1 a 128 a concentração inibitória mínima de células planctônicas, a fim de verificar a capacidade dessas MQSs em eliminar os biofilmes maduros.

Os valores CIMB<sub>50</sub> das MQSs foram em média 73, 8 e 46 vezes maiores do que os valores CIM do farnesol, 2-feniletanol e tirosol, respectivamente. Isso demonstra um aumento da tolerância a essa droga quando o fungo está na forma de biofilme. Essa maior tolerância de células sésseis pode estar relacionada a várias características observadas em biofilmes, como superexpressão de bombas de efluxo, alterações na fisiologia celular geral, alta densidade celular e presença de matriz extracelular (BORGHI; BORGO; MORACE, 2016).

No que tange o efeito de moléculas como terpinen-4-ol, moléculas de quorum sensing e antifúngicos de uso clínico sobre biofilmes fúngicos, diferentes técnicas podem ser utilizadas para averiguar seu potencial inibitório. As técnicas colorimétricas comumente utilizadas, como ensaio de redução de XTT ou MTT, visam demonstrar a redução na viabilidade celular dos biofilmes após tratamento com o composto avaliado. Outras técnicas, como a microscopia confocal de varredura a laser, demonstra visualmente o efeito antifúngico observado pelas técnicas colorimétricas (AZEREDO et al., 2017; WILSON et al., 2017). Embora as imagens adquiridas por microscopia sejam comumente utilizadas para ilustrar ou descrever apenas de forma qualitativa o efeito antimicrobiano, elas possuem um grande potencial para exploração e extração de dados quantitativos do experimento.

A capacidade de processar e analisar o grande volume de imagens produzidas pela técnicas de microscopia aumenta a necessidade de ferramentas especializadas (WIESMANN et al., 2015). Há uma série de ferramentas de processamento de imagens comerciais e de código aberto disponíveis, e a gama de funcionalidades implementadas é significativa (COLLINS, 2007; HEYDORN et al., 2000a). No entanto, o propósito geral da maioria dessas ferramentas dificulta o domínio ou o uso específico do aplicativo por leigos, ou seja, não é fácil para um pesquisador usar esse software geral para analisar imagens biológicas, sem compreender as especificidades do processamento de imagens e algoritmos de análise (WIESMANN et al., 2015). Assim, o desenvolvimento de ferramentas de análise de imagens biológicas para o usuário final é considerado útil (WILSON et al., 2017), essencialmente para a análise de resultados de fluorescência obtidos por metodologias de avaliação da atividade antifúngica de drogas.

O presente estudo também se destinou a desenvolver um plugin, denominado QuantyFilm, para quantificação de fluorescência em imagens biofilmes, adquiridas por microscopia confocal de varredura a laser. A fim de verificar a eficácia do plugin QuantyFilm, os dados da quantificação foram confrontados com dados de ensaio de redução de XTT, teste comumente utilizado para avaliar o efeito inibitório de drogas sobre biofilmes (CORTE et al., 2019).

A alta correlação ( $r$ ) encontrada entre os dados obtidos pelas duas metodologias foi de 0,9824 (0,9724 - 0,9888), demonstrando a possível aplicação desta técnica em estudos com foco na avaliação da atividade antimicrobiana de drogas. Até o estágio atual de desenvolvimento da ferramenta, mais esforço foi colocado na estruturação do código em linguagem aberta do que na exploração da diversidade de usos possíveis. Outras melhorias de usabilidade podem incluir a padronização de quantificação de fluorescências advindas de fluoróforos em diferentes espectros de cor.

## 8 CONCLUSÕES

- Terpinen-4-ol possui atividade antifúngica contra células planctônicas e biofilmes maduros de *Sporothrix* spp., nas formas filamentosa e leveduriforme;
- Terpinen-4-ol reduz o teor de ergosterol celular em células leveduriformes de *Sporothrix* spp.;
- Terpinen-4-ol apresenta sinergismo com itraconazol e terbinafina frente células planctônicas e biofilmes maduros de *Sporothrix* spp., nas formas filamentosa e leveduriforme;
- Farnesol, 2-feniletanol e tirosol possuem atividade antifúngica contra células planctônicas e biofilmes maduros de *Sporothrix* spp., nas suas formas filamentosa e leveduriforme;
- Farnesol e 2-feniletanol reduzem, em concentrações sub-inibitórias, a formação de biofilmes de *Sporothrix* spp., na sua forma filamentosa;
- Tirosol estimula, em concentrações sub-inibitórias, a produção de biofilme de *Sporothrix* spp., na sua forma filamentosa;
- 2-feniletanol e tirosol reduzem, em concentrações sub-inibitórias, a formação de biofilmes de *Sporothrix* spp., na sua forma leveduriforme;
- O *plugin* QuanyFilm gera resultados de quantificação de fluorescência de Syto9 em imagens de microscopia confocal de biofilmes de *Sporothrix* spp. correlacionáveis com a quantificação de atividade metabólica por ensaio de redução de XTT.

## REFERÊNCIAS

ALEM, M. A. S.; OTEEF, M. D. Y.; FLOWERS, T. H.; DOUGLAS, L. J. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in *quorum sensing* and biofilm development. **Eukaryot. Cell**, v. 5, n. 10, p. 1770–1779, 2006.

ALMEIDA-PAES, R.; BORBA-SANTOS, L. P.; ROZENTAL, S.; MARCO, S.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; DA CUNHA, M. M. L. Melanin biosynthesis in pathogenic species of *Sporothrix*. **Fungal Biol. Rev.**, v. 31, n. 1, p. 50–59, 2017a.

ALMEIDA-PAES, R.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; BRITO-SANTOS, F.; ALMEIDA-SILVA, F.; OLIVEIRA, M. M. E.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. 1–13, 2016a.

ALMEIDA-PAES, R.; DE OLIVEIRA, L. C.; OLIVEIRA, M. M. E.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Phenotypic Characteristics Associated with Virulence of Clinical Isolates from the *Sporothrix* Complex. **Biomed Res. Int.**, v. 2015, p. 1–10, 2015.

ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. M.; FREITAS, D. F.; VALLE, A. C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in humans appears to be unrelated to *in vivo* resistance. **Med. Mycol.**, v. 55, n. 5, p. 507–517, 2016b.

ALMEIDA-PAES, R.; BRITO-SANTOS, F.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; MACHADO, A. C. S.; OLIVEIRA, M. M. E.; PEREIRA, S. A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Minimal inhibitory concentration distributions and epidemiological cutoff values of five antifungal agents against *Sporothrix brasiliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 5, p. 376–381, 2017b.

ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. M. E.; FREITAS, D. F. S.; VALLE, A. C. F. DO; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in humans appears to be unrelated to *in vivo* resistance. **Med. Mycol.**, v. 55, n. 5, p. 507–517, 2017c.

ALMEIDA, F. DE; SAMPAIO, S. A.; LACAZ, C. D. S.; FERNANDES, J. D. C. Statistical data on sporotrichosis; analysis of 344 cases. **An. bras. Derm. Sif.**, v. 30, n. 1, 1955.

ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genet. Biol.**, v. 78, p. 55–58, 2015.

ALVAREZ-RIVERO, V.; HERNANDEZ-CASTRO, R.; MORENO-COUTIÑO, G.; LOZANO-PLATONOFF, A. Disseminated Sporotrichosis: An Important Differential Diagnosis for Venous Ulcers. **Adv. Skin Wound Care**, 2020.

AMIRALI, M. H.; LIEBENBERG, J.; PILLAY, S.; NEL, J. Sporotrichosis in renal transplant patients: two case reports and a review of the literature. **J. Med. Case Rep.**, v. 14, n. 1, p. 79, 2020.

ANDERSSON, N. W.; THOMSEN, S. F.; ANDERSEN, J. T. Evaluation of Association between Oral and Topical Terbinafine Use in Pregnancy and Risk of Major Malformations and Spontaneous Abortion. **JAMA Dermatology**, v. 156, n. 4, p. 375–383, 2020.

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

AZEREDO, J.; AZEVEDO, N. F.; BRIANDET, R.; CERCA, N.; COENYE, T.; COSTA, A. R.; DESVAUX, M.; DI BONAVENTURA, G.; HÉBRAUD, M.; JAGLIC, Z. Critical review on biofilm methods. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 43, n. 3, p. 313–351, 2017.

BAKER, J. H.; GOODPASTURE, H. C.; KUHNS JR, H. R.; RINALDI, M. G. Fungemia caused by an amphotericin B-resistant isolate of *Sporothrix schenckii*. Successful treatment with itraconazole. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 113, n. 11, p. 1279–1281, 1989.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **J. Pharm. Anal.**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BARROS, M. B. D. L.; ALMEIDA-PAES, R. DE; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 24, n. 4, p. 293–308, 2011.

- BAZZI, T.; MELO, S. M. P. DE; FIGHERA, R. A.; KOMMERS, G. D. Clinical, epidemiological, histomorphological and histochemical characteristics of the feline sporotrichosis. **Pesqui. Veterinária Bras.**, v. 36, n. 4, p. 303–311, 2016.
- BELENKY, P.; CAMACHO, D.; COLLINS, J. J. Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway. **Cell Rep.**, v. 3, n. 2, p. 350–358, 2013.
- BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nat. Rev. Microbiol.**, p. 1–13, 2020.
- BERNARDO, S. M.; RANE, H. S.; CHAVEZ-DOZAL, A.; LEE, S. A. Secretion and filamentation are mediated by the *Candida albicans* t-SNAREs Sso2p and Sec9p. **FEMS Yeast Res.**, v. 14, n. 5, p. 762–775, 2014.
- BONIFAZ, A.; ROJAS-PADILLA, R.; TIRADO-SÁNCHEZ, A.; PONCE, R. M. Sporotrichosis: The-State-of-The-Art. In: RAZZAGHI-ABYANEH, M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAI, M. (Eds.). **Medical Mycology - Current Trends and Future Prospects**. New York: CCR Press, 2016. p. 234–253.
- BONIFAZ, A.; TIRADO-SÁNCHEZ, A. Cutaneous Disseminated and Extracutaneous Sporotrichosis: Current Status of a Complex Disease. **J. Fungi**, v. 3, n. 6, p. 1–13, 2017.
- BORBA-SANTOS, L. P.; RODRIGUES, A. M.; GAGINI, T. B.; FERNANDES, G. F.; CASTRO, R.; DE CAMARGO, Z. P.; NUCCI, M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ISHIDA, K.; ROZENTAL, S. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. **Med. Mycol.**, v. 53, n. 2, p. 178–188, 2015.
- BORBA-SANTOS, L. P.; VISBAL, G.; GAGINI, T.; RODRIGUES, A. M.; DE CAMARGO, Z. P.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ISHIDA, K.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S.  $\Delta$ 24-Sterol Methyltransferase Plays an Important Role in the Growth and Development of *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Front. Microbiol.**, v. 7, n. 311, p. 1–13, 2016.
- BORGHI, E.; BORGIO, F.; MORACE, G. Fungal biofilms: update on resistance. In: **Fungal Biofilms and related infections**. [s.l.] Springer, 2016. p. 37–47.
- BOSCO, S. DE M. G.; DA PAZ, G. S.; CHECHI, J. L.; OLIVEIRA, A. L.; DO PRADO, A.

C.; YAMAUCHI, D. H.; GARCES, H. G.; BAGAGLI, E. Endemic Mycoses in Americas. In: **Recent Trends in Human and Animal Mycology**. [s.l.] Springer, 2019. p. 143–192.

BOSE, S. K.; CHAUHAN, M.; DHINGRA, N.; CHHIBBER, S.; HARJAI, K. Terpinen-4-ol attenuates *quorum sensing* regulated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Future Microbiol.**, v. 15, n. 2, p. 127–142, 2020.

BRACKMAN, G.; COENYE, T. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. **Curr. Pharm. Des.**, v. 21, n. 1, p. 5–11, 2015.

BRASIL, M. DA S. **PORTARIA Nº 264, DE 17 DE FEVEREIRO DE 2020** Brasília, 2020.

BRILHANTE, R. S. N.; DE LIMA, R. A. C.; DE FARIAS MARQUES, F. J.; SILVA, N. F.; CAETANO, É. P.; CASTELO, D. DE S. C. M.; BANDEIRA, T. DE J. P. G.; MOREIRA, J. L. B.; DE AGUIAR CORDEIRO, R.; MONTEIRO, A. J. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. **J. Med. Microbiol.**, v. 64, n. 4, p. 394–399, 2015a.

BRILHANTE, R. S. N.; CAETANO, É. P.; DE LIMA, R. A. C.; DE FARIAS MARQUES, F. J.; CASTELO, D. DE S. C. M.; DE MELO, C. V. S.; DE MELO GUEDES, G. M.; DE OLIVEIRA, J. S.; DE CAMARGO, Z. P.; MOREIRA, J. L. B. Terpinen-4-ol, tyrosol, and  $\beta$ -lapachone as potential antifungals against dimorphic fungi. **Brazilian J. Microbiol.**, v. 47, n. 4, p. 917–924, 2016.

BRILHANTE, R. S. N.; SILVA, M. L. Q. DA; PEREIRA, V. S.; DE OLIVEIRA, J. S.; MACIEL, J. M.; SILVA, I. N. G. DA; GARCIA, L. G. S.; GUEDES, G. M. DE M.; CORDEIRO, R. DE A.; PEREIRA-NETO, W. DE A. Potassium iodide and miltefosine inhibit biofilms of *Sporothrix schenckii* species complex in yeast and filamentous forms. **Med. Mycol.**, v. 57, n. 6, p. 764–772, 2019.

BRILHANTE, R. S. N.; PEREIRA, V. S.; OLIVEIRA, J. S. DE; LOPES, R. G. P.; RODRIGUES, A. M.; DE CAMARGO, Z. P.; PEREIRA-NETO, W. DE A.; CASTELO-BRANCO, D. D. S. C. M.; CORDEIRO, R. DE A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. Pentamidine inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. **Future Microbiol.**, v. 13, p. 1129–1140, 2018a.



BRILHANTE, R. S. N.; SILVA, N. F.; MARQUES, F. J. DE F.; CASTELO-BRANCO, D. DE S. C. M.; LIMA, R. A. C. DE; MALAQUIAS, A. D. M.; CAETANO, E. P.; BARBOSA, G. R.; CAMARGO, Z. P. DE; RODRIGUES, A. M.; MONTEIRO, A. J.; BANDEIRA, T. D. J. P. G.; CORDEIRO, R. D. A.; SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B.; ROCHA, M. F. G. In vitro inhibitory activity of terpenic derivatives against clinical and environmental strains of the *Sporothrix schenckii* complex. **Med. Mycol.**, v. 53, n. 2, p. 93–98, 2015b.

BRILHANTE, R. S. N.; DE LIMA, R. A. C.; CAETANO, E. P.; LEITE, J. J. G.; DE SOUZA COLLARES MAIA CASTELO-BRANCO, D.; RIBEIRO, J. F.; DE JESUS PINHEIRO GOMES BANDEIRA, T.; DE AGUIAR CORDEIRO, R.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; CASTELO, D. DE S. C. M.; RIBEIRO, J. F.; BANDEIRA, T. DE J. P. G.; DE AGUIAR CORDEIRO, R.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C. Effect of farnesol on growth, ergosterol biosynthesis, and cell permeability in *Coccidioides posadasii*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, n. 5, p. 2167–2170, 2013.

BRILHANTE, R. S. N.; AGUIAR, F. R. M.; SILVA, M. L. Q.; OLIVEIRA, J. S.; CAMARGO, Z. P.; RODRIGUES, A. M.; PEREIRA, V. S.; SERPA, R.; CASTELO-BRANCO, D. DE S. C.; CORREIA, E. E. M.; PEREIRA-NETO, W. A.; CORDEIRO, R. DE A.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Antifungal susceptibility of *Sporothrix schenckii* complex biofilms. **Med. Mycol.**, v. 56, n. 3, p. 297–306, 2018b.

BRILHANTE, R. S. N.; DE OLIVEIRA, J. S.; EVANGELISTA, A. J. DE J.; PEREIRA, V. S.; ALENCAR, L. P.; CASTELO-BRANCO, D. DE S. C.; CÂMARA, L. M. C.; DE LIMA-NETO, R. G.; CORDEIRO, R. DE A.; SIDRIM, J. J. C. In vitro effects of promethazine on cell morphology and structure and mitochondrial activity of azole-resistant *Candida tropicalis*. **Med. Mycol.**, v. 56, n. 8, p. 1012–1022, 2018c.

BRILHANTE, R. S. N.; CORREIA, E. E. M.; GUEDES, G. M. DE M.; DE OLIVEIRA, J. S.; CASTELO-BRANCO, D. DE S. C. M.; CORDEIRO, R. DE A.; PINHEIRO, A. DE Q.; CHAVES, L. J. Q.; PEREIRA NETO, W. DE A.; SIDRIM, J. J. C. In vitro activity of azole derivatives and griseofulvin against planktonic and biofilm growth of clinical isolates of dermatophytes. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 449–454, 2018d.

BUCCI, A. R.; MARCELINO, L.; MENDES, R. K.; ETCHEGARAY, A. The antimicrobial and antiadhesion activities of micellar solutions of surfactin, CTAB and CPCl with terpinen-

4-ol: applications to control oral pathogens. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 34, n. 6, p. 86, 2018.

CAL, K.; KUPIEC, K.; SZNITOWSKA, M. Effect of physicochemical properties of cyclic terpenes on their ex vivo skin absorption and elimination kinetics. **J. Dermatol. Sci.**, v. 41, n. 2, p. 137–142, 2006.

CAPOOR, M. R.; RAMESH, V.; KHANNA, G.; SINGH, A.; AGGARWAL, P. Sporotrichosis in Delhi among the migrant population from Uttarakhand, India. **Trop. Doct.**, v. 41, n. 1, p. 46–48, 2011.

CARRADA-BRAVO, T.; OLVERA-MACÍAS, M. I. New observations on the ecology and epidemiology of *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Rev. Latinoam. Patol. Clínica**, v. 60, n. 1, p. 5–24, 2013.

CARVALHO, L. M. V. DE; PIMENTEL, M. I. F.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; VALETE-ROSALINO, C. M.; LYRA, M. R.; SALGUEIRO, M. DE M.; SAHEKI, M. N.; MADEIRA, M. DE F.; MOUTA-COMFORT, E.; ANTONIO, L. DE F. Sporotrichoid leishmaniasis: a cross-sectional clinical, epidemiological and laboratory study in Rio de Janeiro State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 59, n. e53, p. 1–6, 2017.

CASTREJÓN, O. V; ROBLES, M.; ARROYO, O. E. Fatal fungaemia due to *Sporothrix schenckii*. **Mycoses**, v. 38, n. 9-10, p. 373–376, 1995.

CHAKRABARTI, A. Epidemiology of Endemic Mycoses in Asia. In: **Clinical Practice of Medical Mycology in Asia**. [s.l.] Springer, 2020. p. 39–49.

CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; MOCHIZUKI, T.; LI, S. Global epidemiology of sporotrichosis. **Med. Mycol.**, v. 53, n. 1, p. 3–14, 2015.

CHEN, H.; FUJITA, M.; FENG, Q.; CLARDY, J.; FINK, G. R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 101, n. 14, p. 5048–5052, 2004.

CHEN, H.; FINK, G. R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. **Genes Dev.**, v. 20, n. 9, p. 1150–1161, 2006.

CHONGKAE, S.; NOSANCHUK, J. D.; PRUKSAPHON, K.; LALIAM, A.; PORNSUWAN, S.; YOUNGCHIM, S. Production of melanin pigments in saprophytic fungi in vitro and during infection. **J. Basic Microbiol.**, v. 59, n. 11, p. 1092–1104, 2019.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Fourth Edition.** CLSI document M27ed4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards, 2017a.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard - Third Edition.** CLSI document M38ed3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017b.

COLES, F. B.; SCHUCHAT, A.; HIBBS, J. R.; KONDRACKI, S. F.; SALKIN, I. F.; DIXON, D. M.; CHANG, H. G.; DUNCAN, R. A.; HURD, N. J.; MORSE, D. L. A multistate outbreak of sporotrichosis associated with sphagnum moss. **Am. J. Epidemiol.**, v. 136, n. 4, p. 475–487, 1992.

COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. **Biotechniques**, v. 43, n. 1 Suppl, p. 25–30, 2007.

CORDEIRO, R. A.; TEIXEIRA, C. E. C.; BRILHANTE, R. S. N.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; PAIVA, M. A. N.; GIFFONI LEITE, J. J.; LIMA, D. T.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. **Med. Mycol.**, v. 51, n. 1, p. 53–59, 2013.

CORDEIRO, R. A.; NOGUEIRA, G. C.; BRILHANTE, R. S. N.; TEIXEIRA, C. E. C.; MOURÃO, C. I.; CASTELO, D. DE S. C. M.; PAIVA, M. DE A. N.; RIBEIRO, J. F.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; DE AGUIAR CORDEIRO, R.; NOGUEIRA, G. C.; BRILHANTE, R. S. N.; TEIXEIRA, C. E. C.; MOURÃO, C. I.; CASTELO, D. DE S. C. M.; PAIVA, M. DE A. N.; RIBEIRO, J. F.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C. Farnesol inhibits in vitro growth of the *Cryptococcus neoformans* species complex with no significant changes in virulence-related exoenzymes. **Vet. Microbiol.**, v. 159, n. 3–4, p. 375–380, 2012.

CORDEIRO, R. DE A.; TEIXEIRA, C. E. C.; BRILHANTE, R. S. N.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ALENCAR, L. P.; DE OLIVEIRA, J. S.; MONTEIRO, A. J.; BANDEIRA, T. J. P. G.; SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Exogenous tyrosol inhibits

planktonic cells and biofilms of *Candida* species and enhances their susceptibility to antifungals. **FEMS Yeast Res.**, v. 15, n. 4, p. fov012, 2015.

CORDEIRO, R. R. DE A.; PEREIRA, L. M. G. L.; DE SOUSA, J. J. K.; SERPA, R.; ANDRADE, A. A. R. C.; PORTELA, F. F. V. M.; EVANGELISTA, A.; SALES, J. A.; AGUIAR, A. L. R. A.; MENDES, P. P. B. L.; BRILHANTE, R.; SIDRIM, J.; CASTELO-BRANCO, D.; ROCHA, M.; EVANGELISTA, A. J. DE J.; SALES, J. A.; AGUIAR, A. L. R. A.; MENDES, P. P. B. L. Farnesol inhibits planktonic cells and antifungal-tolerant biofilms of *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin*. **Med. Mycol.**, v. 57, n. 8, p. 1038–1045, 2019.

CORTE, L.; CASAGRANDE PIERANTONI, D.; TASCINI, C.; ROSCINI, L.; CARDINALI, G. Biofilm specific activity: a measure to quantify microbial biofilm. **Microorganisms**, v. 7, n. 3, p. 73, 2019.

COSTA, R. O.; MACEDO, P. M. DE; CARVALHAL, A.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R. Use of potassium iodide in dermatology: updates on an old drug. **An. Bras. Dermatol.**, v. 88, n. 3, p. 396–402, 2013.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 91, n. 3, p. 492–497, 2001.

CRESTANI, L.; SOUZA, B. DE C. E.; KAKIZAKI, P.; VALENTE, N. Y. S. Therapeutic failure with itraconazole in sporotrichosis due to bariatric surgery. **An. Bras. Dermatol.**, v. 95, n. 2, p. 241–243, 2020.

CRUZ, L. C. H. DA. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Veterinária e Zootec.**, v. 20, p. 8–28, 2013.

DANGERFIELD, L. F.; GEAR, J. Sporotrichosis among Miners on the Witwatersrand Gold Mines. **South African Med. J.**, v. 15, n. 7, 1941.

DE HOOG, G. S.; CHATURVEDI, V.; DENNING, D. W.; DYER, P. S.; FRISVAD, J. C.; GEISER, D.; GRÄSER, Y.; GUARRO, J.; HAASE, G.; KWON-CHUNG, K.-J. Commentaries: Name Changes in Medically Important Fungi and Their Implications for

Clinical Practice. **J. Clin. Microbiol.**, v. 53, n. 4, p. 1056–1062, 2015.

DELLA TERRA, P. P.; RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G. F.; NISHIKAKU, A. S.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z. P. Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 8, p. e0005903, 2017.

DELMONDES, G. DE A.; BEZERRA, D. S.; DIAS, D. DE Q.; BORGES, A. DE S.; ARAÚJO, I. M.; DA CUNHA, G. L.; BANDEIRA, P. F. R.; BARBOSA, R.; COUTINHO, H. D. M.; FELIPE, C. F. B. Toxicological and pharmacologic effects of farnesol (C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O): a descriptive systematic review. **Food Chem. Toxicol.**, v. 129, p. 169–200, 2019.

DERENGOWSKI, L. S.; DE-SOUZA-SILVA, C.; BRAZ, S. V.; MELLO-DE-SOUSA, T. M.; BÁO, S. N.; KYAW, C. M.; SILVA-PEREIRA, I. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v. 8, n. 1, p. 13, 2009.

DEVI, K. R.; DEVI, M. U.; SINGH, T. N.; DEVI, K. S.; SHARMA, S. S.; SINGH, L. R.; SINGH, H. L.; SINGH, N. B. Emergence of sporotrichosis in Manipur. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 24, n. 3, p. 216, 2006.

DO MONTE ALVES, M.; PIPOLO MILAN, E.; DA SILVA-ROCHA, W. P.; SOARES DE SENA DA COSTA, A.; ARAÚJO MACIEL, B.; CAVALCANTE VALE, P. H.; DE ALBUQUERQUE, P. R.; LOPES LIMA, S.; SALLES DE AZEVEDO MELO, A.; MESSIAS RODRIGUES, A.; CHAVES, G. M. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Northeast Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 14, n. 5, p. e0008141, 2020.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiol.**, v. 11, n. 1, p. 30–6, 2003.

ESPINEL-INGROFF, A.; ABREU, D. P. B.; ALMEIDA-PAES, R.; BRILHANTE, R. S. N.; CHAKRABARTI, A.; CHOWDHARY, A.; HAGEN, F.; CÓRDOBA, S.; GONZALEZ, G. M.; GOVENDER, N. P. Multicenter and international study of MIC/MEC distributions for

definition of epidemiological cutoff values (ECVs) for species of *Sporothrix* identified by molecular methods. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 61, n. 10, p. e01057-17, 2017.

ESPINOSA-TEXIS, A.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, F.; LAVALLE, P.; BARBARUBIO, J.; LOPEZ-MARTINEZ, R. Study of 50 patients with sporotrichosis. Clinical and laboratory assessment. **Gac. Med. Mex.**, v. 137, n. 2, p. 111–116, 2001.

ESTRADA-CASTAÑÓN, R.; ESTRADA-CHÁVEZ, G.; CHÁVEZ-LÓPEZ, M. DE G. Diagnosis and Management of Fungal Neglected Tropical Diseases In Community Settings—Mycetoma and Sporotrichosis. **Trop. Med. Infect. Dis.**, v. 4, n. 2, p. 81, 2019.

FEENEY, K. T.; ARTHUR, I. H.; WHITTLE, A. J.; ALTMAN, S. A.; SPEERS, D. J. Outbreak of sporotrichosis, Western Australia. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, n. 8, p. 1228, 2007.

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

FERNANDES, T.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida tropicalis* biofilm's matrix — involvement on its resistance to amphotericin B. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 83, n. 2, p. 165–169, 2015.

FINDRI-GUŠTEK, Š.; PETEK, M. J.; SARAJLIJA, H.; MRŠIĆ, G.; DŽEPINA, A. M.; OREŠČANIN, V. The correlation of the lifestyle and medical conditions with the vaginal infections and production of 2-phenylethanol. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 286, n. 3, p. 671–682, 2012.

FOREZI, L. DA S.; BORBA-SANTOS, L. P.; CARDOSO, M. F. C.; FERREIRA, V. F.; ROZENTAL, S.; DE C DA SILVA, F. Synthesis and Antifungal Activity of Coumarins Derivatives Against *Sporothrix* spp. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 18, n. 2, p. 164–171, 2018.

FRANCESCONI, G.; FRANCESCONI DO VALLE, A. C.; PASSOS, S. L.; DE LIMA BARROS, M. B.; DE ALMEIDA PAES, R.; CURI, A. L. L.; LIPORAGE, J.; PORTO, C. F.; GALHARDO, M. C. G. Comparative Study of 250 mg/day Terbinafine and 100 mg/day Itraconazole for the Treatment of Cutaneous Sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p.

349–354, 2011.

FRANCISCONI, R. S.; HUACHO, P. M. M.; TONON, C. C.; BORDINI, E. A. F.; CORREIA, M. F.; SARDI, J. DE C. O.; SPOLIDORIO, D. M. P. Antibiofilm efficacy of tea tree oil and of its main component terpinen-4-ol against *Candida albicans*. **Braz. Oral Res.**, v. 34, 2020.

FREITAS, D. F. S.; DO VALLE, A. C. F.; DA SILVA, M. B. T.; CAMPOS, D. P.; LYRA, M. R.; DE SOUZA, R. V.; VELOSO, V. G.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; BASTOS, F. I.; GALHARDO, M. C. G. Sporotrichosis: an emerging neglected opportunistic infection in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 8, p. e3110, 2014.

FREITAS, D. F. S.; DE SIQUEIRA HOAGLAND, B.; DO VALLE, A. C. F.; FRAGA, B. B.; DE BARROS, M. B.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A.; DE ALMEIDA-PAES, R.; CUZZI, T.; ROSALINO, C. M. V.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Sabouraudia**, v. 50, n. 2, p. 170–178, 2012.

GAO, L.; SUN, Y.; HE, C.; ZENG, T.; LI, M. Synergistic effects of tacrolimus and azoles against *Exophiala dermatitidis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 61, n. 12, p. e00948-17, 2017.

GAO, L.; SUN, Y. In vitro interactions of antifungal agents and tacrolimus against *Aspergillus biofilms*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 59, n. 11, p. 7097–7099, 2015.

GEZUELE, E.; DA ROSA, D. Importance of the sporotrichosis asteroid body for the rapid diagnosis of sporotrichosis. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 22, n. 3, p. 147–150, 2005.

GHANNOUM, M.; ISHAM, N. Terbinafine. In: **Kucers the Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, Seventh Edition**. [s.l.] CRC Press, jan. 2017. p. 2709–2719.

GOLD, J. A. W.; DERADO, G.; MODY, R. K.; BENEDICT, K. Sporotrichosis-Associated Hospitalizations, United States, 2000–2013. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 22, n. 10, p. 1817–1820, 2016.

GOMPERTZ, O. F.; RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G. F.; BENTUBO, H. D. L.; DE CAMARGO, Z. P.; PETRI, V. Atypical clinical presentation of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* resistant to itraconazole. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, n. 6, p. 1218–1222, 2016.

GOVENDER, N. P.; MAPHANGA, T. G.; ZULU, T. G.; PATEL, J.; WALAZA, S.; JACOBS, C.; EBONWU, J. I.; NTULI, S.; NAICKER, S. D.; THOMAS, J. An outbreak of lymphocutaneous sporotrichosis among mine-workers in South Africa. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 9, p. e0004096, 2015.

GRAY, K. C.; PALACIOS, D. S.; DAILEY, I.; ENDO, M. M.; UNO, B. E.; WILCOCK, B. C.; BURKE, M. D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 109, n. 7, p. 2234–2239, 2012.

GREMIÃO, I. D. F.; MIRANDA, L. H. M.; REIS, E. G.; RODRIGUES, A. M.; PEREIRA, S. A. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLoS Pathog.**, v. 13, n. 1, p. e1006077, 2017.

GUMAA, S. A. Sporotrichosis in Sudan. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, n. 6, p. 637–640, 1978.

GUPTA, V. K.; TUOHY, M. G. **Laboratory Protocols in Fungal Biology**. London: Springer, 2013.

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

HALDAR, N.; SHARMA, M. K.; GUGNANI, H. C. Sporotrichosis in north-east India. **Mycoses**, v. 50, n. 3, p. 201–204, 2007.

HALL, R. A.; TURNER, K. J.; CHALOUPKA, J.; COTTIER, F.; DE SORDI, L.; SANGLARD, D.; LEVIN, L. R.; BUCK, J.; MÜHLSCHLEGEL, F. A. The quorum-sensing molecules farnesol/homoserine lactone and dodecanol operate via distinct modes of action in *Candida albicans*. **Eukaryot. Cell**, v. 10, n. 8, p. 1034–1042, 2011.



HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 53, n. 6, p. 1081–1085, 2004.

HAN, H. S. Sporothrichosis. In: NOLI, C.; COLOMBO, S. (Eds.). **Feline Dermatology**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 329–343.

HAN, T.-L.; TUMANOV, S.; CANNON, R. D.; VILLAS-BOAS, S. G. Metabolic response of *Candida albicans* to phenylethyl alcohol under hyphae-inducing conditions. **PLoS One**, v. 8, n. 8, 2013.

HARDING, M. W.; MARQUES, L. L. R.; HOWARD, R. J.; OLSON, M. E. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends Microbiol.**, v. 17, n. 11, p. 475–480, 2009.

HAY, R.; DENNING, D. W.; BONIFAZ, A.; QUEIROZ-TELLES, F.; BEER, K.; BUSTAMANTE, B.; CHAKRABARTI, A.; DE GUADALUPE CHAVEZ-LOPEZ, M.; CHILLER, T.; CORNET, M.; ESTRADA, R.; ESTRADA-CHAVEZ, G.; FAHAL, A.; GOMEZ, B. L.; LI, R.; MAHABEER, Y.; MOSAM, A.; RAMAROZATOVO, L. S.; ANDRIANARIVELO, M. R.; RABENJA, F. R.; VAN DE SANDE, W.; ZIJLSTRA, E. E. The diagnosis of fungal neglected tropical diseases (fungal NTDs) and the role of investigation and laboratory tests: An expert consensus report. **Trop. Med. Infect. Dis.**, v. 4, n. 4, 2019.

HAYASHI, S.; ISHIKAWA, S.; ISHII, E.; KOIKE, M.; KAMINAGA, T.; HAMASAKI, Y.; SAIRENCHI, T.; KOBASHI, G.; IGAWA, K. Anti-Inflammatory Effects of Potassium Iodide on SDS-Induced Murine Skin Inflammation. **J. Invest. Dermatol.**, 2020.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **J. Exp. Med.**, v. 5, n. 1, p. 77, 1900.

HELM, M.; BERMAN, C. The clinical, therapeutic and epidemiological features of the sporotrichosis infection on the mines. **Proc. Transvaal Mine Med. Off. Assoc. Sporotrichosis Infect. mines Witwatersrand**, p. 59–67, 1947.

HEYDORN, A.; HEYDORN, A.; NIELSEN, A. T.; NIELSEN, A. T.; HENTZER, M.; HENTZER, M. Quantification of biofilm structures by the novel computer program. **Image**

**Process.**, v. 146, n. 2000, p. 2395–2407, 2000a.

HEYDORN, A.; NIELSEN, A. T.; HENTZER, M.; STERNBERG, C.; GIVSKOV, M.; ERSBØLL, B. K.; MOLIN, S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology**, v. 146, n. 10, p. 2395–2407, 2000b.

HOGAN, D. A. Quorum sensing: alcohols in a social situation. **Curr. Biol.**, v. 16, n. 12, p. R457–R458, 2006.

HØIBY, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. **APMIS**, v. 125, n. 4, p. 272–275, 2017.

HORNBY, J. M.; JENSEN, E. C.; LISEC, A. D.; TASTO, J. J.; JAHNKE, B.; SHOEMAKER, R.; DUSSAULT, P.; NICKERSON, K. W. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 7, p. 2982–2992, 2001.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Front. Microbiol.**, v. 3, p. 12, 2012.

ISHIDA, K.; CASTRO, R. A.; TORRADO, J. J.; SERRANO, D. R.; BORBA-SANTOS, L. P.; QUINTELLA, L. P.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S.; LOPES-BEZERRA, L. M. Efficacy of a poly-aggregated formulation of amphotericin B in treating systemic sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v. 56, n. 3, p. 288–296, 2018.

JAKAB, Á.; TÓTH, Z.; NAGY, F.; NEMES, D.; BÁCSKAY, I.; KARDOS, G.; EMRI, T.; PÓCSI, I.; MAJOROS, L.; KOVÁCS, R. Physiological and transcriptional responses of *Candida parapsilosis* to exogenous tyrosol. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 85, n. 20, p. e01388-19, 2019.

JIN, D.; GU, B.; XIONG, D.; HUANG, G.; HUANG, X.; LIU, L.; XIAO, J. A transcriptomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under the stress of 2-phenylethanol. **Curr. Microbiol.**, v. 75, n. 8, p. 1068–1076, 2018.

JOHNSON, E. M.; CAVLING-ARENDRUP, M. Susceptibility test methods: yeasts and

filamentous fungi. In: **Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition**. New York: American Society of Microbiology, 2015. p. 2255–2281.

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 3, p. 693–715, 2004.

KALKANCI, A.; DIZBAY, M.; SARI, N.; YALCIN, B.; FIDAN, I.; ARMAN, D.; KUSTIMUR, S. Fluconazole, caspofungin, voriconazole in combination with amphotericin B. **Open Med.**, v. 5, n. 2, p. 194–197, 2010.

KHAITAN, B.; GUPTA, V.; ASATI, D.; SESHADRI, D.; RAMAM, M. **Successful treatment outcome with itraconazole and potassium iodide in disseminated sporotrichosis** *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology* Wolters Kluwer Medknow Publications, , 2018.

KIM, D. S.; KIM, J. W.; KIM, S. W. A Case of cutaneous disseminated type of sporotrichosis resistant to itraconazole and terbinafine. **Korean J. Med. Mycol.**, v. 2, n. 2, p. 169–173, 1997.

KOVÁCS, R.; TÓTH, Z.; NAGY, F.; DARÓCZI, L.; BOZÓ, A.; MAJOROS, L. Activity of exogenous tyrosol in combination with caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* sessile cells. **J. Appl. Microbiol.**, v. 122, n. 6, p. 1529–1536, 2017.

KROM, B. P.; WILLEMS, H. M. E. In vitro models for *Candida* biofilm development. In: **Candida Species**. [s.l.] Springer, 2016. p. 95–105.

KUMAR, P.; MISHRA, S.; SINGH, S. Advanced acuity in microbial biofilm genesis, development, associated clinical infections and control. **J. des Anti-infectieux**, v. 19, n. 1, p. 20–31, 2017.

LARSSON, C. E.; GONÇALVES, M. DE A.; ARAUJO, V. C.; DAGLI, M. L. Z.; CORREA, B.; FAVA NETO, C. Esporotricosis felina: aspectos clínicos e zoonóticos. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 31, n. 5, p. 351–358, 1989.

LEDERER, H. T.; SULLIVAN, E.; CRUM-CIANFLONE, N. F. Sporotrichosis as an unusual

case of osteomyelitis: A case report and review of the literature. **Med. Mycol. Case Rep.**, v. 11, p. 31–35, 2016.

LI, H.; LU, Q.; WAN, Z.; ZHANG, J. In vitro combined activity of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 35, n. 6, p. 550–552, 2010.

LIU, P.; CHENG, Y.; YANG, M.; LIU, Y.; CHEN, K.; LONG, C.; DENG, X. Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium molds* of citrus fruits. **BMC Microbiol.**, v. 14, n. 1, p. 242, 2014.

LOPES-BEZERRA, L. M.; MORA-MONTES, H. M.; BONIFAZ, A. *Sporothrix and Sporotrichosis*. In: **Current Progress in Medical Mycology**. New York: Springer, 2017. p. 309–331.

LU, L.; HU, W.; TIAN, Z.; YUAN, D.; YI, G.; ZHOU, Y.; CHENG, Q.; ZHU, J.; LI, M. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. **Chin. Med.**, v. 14, n. 1, p. 11, 2019.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos (Contribuição para o conhecimento das assim chamadas sporotricoses). **Rev. Médica São Paulo**, v. 10, p. 443–450, 1907.

MACEDO, P. M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; OROFINO-COSTA, R. New posology of potassium iodide for the treatment of cutaneous sporotrichosis: study of efficacy and safety in 102 patients. **J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.**, v. 29, n. 4, p. 719–724, 2015.

MACESIC, N.; STONE, N. R. H.; WINGARD, J. R. **Liposomal amphotericin BCRC Press**, 2017.

MADOFF, L. C.; KASPER, D. L. **Introdução às Doenças Infecciosas: Interações Patógeno-Hospedeiro**. [s.l.] AMGH Editora, 2015.

MADRID, I. M.; XAVIER, M. O.; MATTEI, A. S.; FERNANDES, C. G.; GUIM, T. N.; SANTIN, R.; SCHUCH, L. F. D.; NOBRE, M. DE O.; ARAÚJO MEIRELES, M. C. Role of

melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. **Microbes Infect.**, v. 12, n. 2, p. 162–165, 2010.

MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. **Dermatol. Res. Pract.**, v. 1, n. 272376, p. 1–13, 2014.

MAHMOUDI, S.; ZAINI, F.; KORDBACHEH, P.; SAFARA, M.; HEIDARI, M. *Sporothrix schenckii* complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. **Med. Mycol.**, v. 54, n. 6, p. 593–599, 2016.

MAQUERA HUACHO, P. M.; RODRIGUEZ HERRERO, E.; VERSPECHT, T.; PAUWELS, M.; MARCANTONIO JR, E.; PALOMARI SPOLIDORIO, D. M.; TEUGHEL, W. Terpinen-4-ol and carvacrol affect multi-species biofilm composition. **Biofouling**, v. 35, n. 5, p. 561–572, 2019.

MARCOS-ARIAS, C.; ERASO, E.; MADARIAGA, L.; QUINDÓS, G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 11, n. 1, p. 119, 2011.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Comparison of the antifungal activity of micafungin and amphotericin B against *Candida tropicalis* biofilms. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 71, n. 9, p. 2498–2501, 2016.

MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; TRILLES, L.; LAZÉRA, M. D. S.; GUARRO, J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 9, p. 3251–3256, 2006.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 10, p. 3198–3206, 2007.

MARIO, D. A. N.; SANTOS, R. C. V.; DENARDI, L. B.; VAUCHER, R. DE A.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Interference of melanin in the susceptibility profile of *Sporothrix* species to amphotericin B. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 33, n. 1, p. 21–25, 2016.

MARQUES-MELO, E. H.; LESSA, D. F. DA S.; GARRIDO, L. H. A.; NUNES, A. C. B. T.;

CHAVES, K. P.; PORTO, W. J. N.; NOTOMI, M. Felino doméstico como agente transmissor de esporotricose para humano - relato do primeiro caso no estado de alagoas. **Rev. Baiana Saúde Pública**, v. 38, n. 2, p. 490–498, 2014.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. A.; PÉREZ-GARCÍA, L. A.; MELLADO-MOJICA, E.; LÓPEZ, M. G.; MARTÍNEZ-DUNCKER, I.; LÓPEZ-BEZERRA, L. M.; MORA-MONTES, H. M. *Sporothrix schenckii sensu stricto* and *Sporothrix brasiliensis* are differentially recognized by human peripheral blood mononuclear cells. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 843, 2017.

MARTÍNEZ, A.; ROJAS, N.; GARCÍA, L.; GONZÁLEZ, F.; DOMÍNGUEZ, M.; CATALÁN, A. In vitro activity of terpenes against *Candida albicans* and ultrastructural alterations. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 118, n. 5, p. 553–559, 2014.

MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; ROCHA, S. M.; COIMBRA, M. A.; OLIVEIRA, R. Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. **Eukaryot. Cell**, v. 6, n. 12, p. 2429–2436, 2007.

MATOS, A. M.; MOREIRA, L. M.; BARCZEWSKI, B. F.; MATOS, L. X. DE; OLIVEIRA, J. B. DE; PIMENTEL, F.; INES, M.; ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. G.; PINTO, T. C. Identification by MALDI-TOF MS of *Sporothrix brasiliensis* Isolated from a Subconjunctival Infiltrative Lesion in an Immunocompetent Patient. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 22, 2020.

MEHMOOD, A.; LIU, G.; WANG, X.; MENG, G.; WANG, C.; LIU, Y. Fungal Quorum-Sensing Molecules and Inhibitors with Potential Antifungal Activity: A Review. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1950, 2019.

MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Front. Microbiol.**, v. 3, p. 286, 2012.

MESA-ARANGO, A. C.; RUEDA, C.; ROMÁN, E.; QUINTIN, J.; TERRÓN, M. C.; LUQUE, D.; NETEA, M. G.; PLA, J.; ZARAGOZA, O. Cell wall changes in amphotericin B-resistant strains from *Candida tropicalis* and relationship with the immune responses elicited by the host. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 60, n. 4, p. 2326–2335, 2016.

MIALSKI, R.; DE OLIVEIRA JR, J. N.; DA SILVA, L. H.; KONO, A.; PINHEIRO, R. L.; TEIXEIRA, M. J.; GOMES, R. R.; DE QUEIROZ-TELLES, F.; PINTO, F. G.; BENARD, G.

**Chronic meningitis and hydrocephalus due to *Sporothrix brasiliensis* in immunocompetent adults: a challenging entity.** Open Forum Infectious Diseases. **Anais...**Oxford University Press US, 2018

MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. Fungal super glue: the biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. **PLoS Pathog.**, v. 12, n. 9, p. e1005828, 2016.

MONDAL, S.; MAJUMDAR, S. An Approach with Quorum Sensing. **Adv. Endophytic Fungal Res. Present Status Futur. Challenges**, p. 171, 2019.

MONNO, R.; BRINDICCI, G.; ROMEO, O.; DE CAROLIS, E.; CRISEO, G.; SANGUINETTI, M.; FUMAROLA, L.; INGRAVALLO, G.; MARIANI, M.; MONNO, L. Infection caused by *Sporothrix schenckii*: an autochthonous case in Bari, Southern Italy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, p. 1–4, 2020.

MORA-MONTES, H. M.; DANTAS, A. DA S.; TRUJILLO-ESQUIVEL, E.; DE SOUZA BAPTISTA, A. R.; LOPES-BEZERRA, L. M. Current progress in the biology of members of the *Sporothrix schenckii* complex following the genomic era. **FEMS Yeast Res.**, v. 15, n. 6, 2015.

MORAN, G. P.; PINJON, E.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J. Analysis of drug resistance in pathogenic fungi. In: KAVANAGH, K. (Ed.). **Medical mycology: cellular and molecular techniques**. 1. ed. Chichester, England: John Wiley & Sons, 2007. p. 93–113.

MORCIA, C.; MALNATI, M.; TERZI, V. In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1, 8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. **Food Addit. Contam. Part A**, v. 29, n. 3, p. 415–422, 2012.

NARAYANA, P.; SRIHARI, P. Biofilm resistant surfaces and coatings on implants: A review. **Mater. Today Proc.**, v. 18, p. 4847–4853, 2019.

NATH, A. Prediction and molecular insights into fungal adhesins and adhesin like proteins. **Comput. Biol. Chem.**, v. 80, p. 333–340, 2019.

NINOMIYA, K.; MARUYAMA, N.; INOUE, S.; ISHIBASHI, H.; TAKIZAWA, T.; OSHIMA, H.; ABE, S. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) and its main component, terpinen-4-ol protect mice from experimental oral candidiasis. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 35, n. 6, p. 861–865, 2012.

NUNES, G. D. L.; DOS SANTOS CARNEIRO, R.; FILGUEIRA, K. D.; FILGUEIRA, F. G. F.; FERNANDES, T. H. T. Esporotricose felina no município de Itaporanga, estado da Paraíba, Brasil: relato de um caso. **Arq. Ciências Veterinárias e Zool. da UNIPAR**, v. 14, n. 2, 2013.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, n. 1, p. 1, 2003.

OLIVEIRA, J. S. DE; PEREIRA, V. S.; CASTELO-BRANCO, D. DE S. C. M.; CORDEIRO, R. DE A.; SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. The yeast, the antifungal, and the wardrobe: a journey into antifungal resistance mechanisms of *Candida tropicalis*. **Can. J. Microbiol.**, v. 66, n. 6, p. 377–388, 2020.

OLIVEIRA, M. M. E.; ALMEIDA-PAES, R.; CORRÊA-MOREIRA, D.; BORBA, C. D. M.; MENEZES, R. C.; FREITAS, D. F. S.; DO VALLE, A. C. F.; SCHUBACH, A. D. O.; DE LIMA BARROS, M. B.; NOSANCHUK, J. D.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. A case of sporotrichosis caused by different *Sporothrix brasiliensis* strains: Mycological, molecular, and virulence analyses. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 9, 2019.

OLIVEIRA, M. M. E.; FRANCO-DUARTE, R.; ROMEO, O.; PAIS, C.; CRISEO, G.; SAMPAIO, P.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. ARIA. Evaluation of T3B fingerprinting for identification of clinical and environmental *Sporothrix* species. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 362, n. 6, p. 1–7, 2015.

OROFINO-COSTA, R.; MACEDO, P. M. DE; RODRIGUES, A. M.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **An. Bras. Dermatol.**, v. 92, n. 5, p. 606–620, 2017.

OYARCE, J. A.; GARCÍA, C.; ALAVE, J.; BUSTAMANTE, B. Caracterización epidemiológica, clínica y de laboratorio de esporotricosis en pacientes de un hospital de tercer



nivel en Lima-Perú, entre los años 1991 y 2014. **Rev. Chil. infectología**, v. 33, n. 3, p. 315–321, 2016.

OYEDEMI, S. O.; OKOH, A. I.; MABINYA, L. V; PIROCHENVA, G.; AFOLAYAN, A. J. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol,  $\alpha$ -terpineol and g-terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. **African J. Biotechnol.**, v. 8, n. 7, p. 1280–1286, 2009.

PAIXÃO, A. G.; GALHARDO, M. C. G.; ALMEIDA-PAES, R.; NUNES, E. P.; GONÇALVES, M. L. C.; CHEQUER, G. L.; LAMAS, C. DA C. The difficult management of disseminated *Sporothrix brasiliensis* in a patient with advanced AIDS. **AIDS Res. Ther.**, v. 12, p. 16, 2015.

PALUCH, E.; REWAK-SOROCZYŃSKA, J.; JĘDRUSIK, I.; MAZURKIEWICZ, E.; JERMAKOW, K. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, p. 1–11, 2020.

PARKER, N.; STRONG, N.; PICHETSURNTHORN, P.; LALICH, D.; MOORE, T. Disseminated Sporotrichosis With Brain Abscesses in an HIV-Infected Patient. **Cureus**, v. 12, n. 5, p. e8016–e8016, 2020.

PARVEEN, M.; HASAN, M. K.; TAKAHASHI, J.; MURATA, Y.; KITAGAWA, E.; KODAMA, O.; IWAHASHI, H. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 54, n. 1, p. 46–55, 2004.

PIERCE, C. G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A. R.; WORMLEY JR, F. L.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nat. Protoc.**, v. 3, n. 9, p. 1494, 2008.

PIJPER, A.; PULLINGER, B. D. An Outbreak of Sporotrichosis among South African Native Miners. **Lancet**, p. 914–915, 1927.

POLKE, M.; LEONHARDT, I.; KURZAI, O.; JACOBSEN, I. D. Farnesol signalling in *Candida albicans*—more than just communication. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 230–

243, 2018.

PRASAD, R.; SHAH, A. H.; RAWAL, M. K. Antifungals: mechanism of action and drug resistance. In: **Yeast Membrane Transport**. [s.l.] Springer, 2016. p. 327–349.

PU, L.; JINGFAN, F.; KAI, C.; CHAO-AN, L.; YUNJIANG, C. Phenylethanol promotes adhesion and biofilm formation of the antagonistic yeast *Kloeckera apiculata* for the control of blue mold on citrus. **FEMS Yeast Res.**, v. 14, n. 4, p. 536–546, 2014.

QUINTELLA, L. P.; LAMBERT PASSOS, S. R.; FRANCESCONI DO VALE, A. C.; GUTIERREZ GALHARDO, M. C.; DE LIMA BARROS, M. B.; CUZZI, T.; DOS SANTOS REIS, R.; FIGUEIREDO DE CARVALHO, M. H. G.; ZAPPA, M. B.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. **J. Cutan. Pathol.**, v. 38, n. 1, p. 25–32, 2011.

RAMAGE, G.; MARTÍNEZ, J. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, n. 7, p. 979–86, 2006.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **Int. J. Microbiol.**, v. 2012, p. 528521, 2012.

RAMÍREZ-SOTO, M. C.; AGUILAR-ANCORI, E. G.; TIRADO-SÁNCHEZ, A.; BONIFAZ, A. Ecological determinants of sporotrichosis etiological agents. **J. Fungi**, v. 4, n. 3, p. 95, 2018.

RAMOS, A. C. M. O.; DE MEDEIROS OLIVEIRA, I. V. P.; REIS-LIMA, R. K.; DE PAULA, V. V.; FILGUEIRA, K. D. Zoonotic transmission of canine sporotrichosis in northeastern Brazil. **Acta Vet. Bras.**, v. 11, n. 1, p. 79–84, 2017.

REX, J. H.; PFALLER, M. A. Has antifungal susceptibility testing come of age? **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, n. 8, p. 982–989, 2002.

RIPPON, J. W. **Medical mycology; the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. 3<sup>a</sup> ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1988.

RODRIGUES, A. M.; TEIXEIRA, M. DE M.; DE HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M. P.;

PEREIRA, S. A.; FERNANDES, G. F.; BEZERRA, L. M. L.; FELIPE, M. S.; DE CAMARGO, Z. P. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 6, p. e2281, 2013.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G.; ZHANG, Y.; DE CAMARGO, Z. P. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerg. Microbes Infect.**, v. 3, n. 5, p. e32, 2014a.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CÁSSIA PIRES, D.; BRIHANTE, R. S. N.; DA COSTA SIDRIM, J. J.; GADELHA, M. F.; COLOMBO, A. L.; DE CAMARGO, Z. P. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC Infect. Dis.**, v. 14, n. 1, p. 219, 2014b.

RODRIGUES, A. M.; KUBITSCHKE-BARREIRA, P. H.; FERNANDES, G. F.; DE ALMEIDA, S. R.; LOPES-BEZERRA, L. M.; DE CAMARGO, Z. P. Two-dimensional gel electrophoresis data for proteomic profiling of *Sporothrix* yeast cells. **Data Br.**, v. 2, p. 32–38, 2015a.

RODRIGUES, A. M.; KUBITSCHKE-BARREIRA, P. H.; FERNANDES, G. F.; DE ALMEIDA, S. R.; LOPES-BEZERRA, L. M.; DE CAMARGO, Z. P. Immunoproteomic analysis reveals a convergent humoral response signature in the *Sporothrix schenckii* complex. **J. Proteomics**, v. 115, p. 8–22, 2015b.

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

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

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. *Sporothrix* Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission. **PLoS Pathog.**, v. 12, n. 7, p. e1005638, 2016.

- RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, S.; DE CAMARGO, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Med. Mycol.**, v. 51, n. 4, p. 405–12, 2013.
- RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G.; DE CAMARGO, Z. Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of Livestock. In: BAYRY, J. (Ed.). . **Emerging and re-emerging infectious diseases of livestock**. [s.l.] Springer, 2018. p. 391–421.
- RODRIGUES, C. F.; ČERNÁKOVÁ, L. Farnesol and Tyrosol: Secondary Metabolites with a Crucial quorum-sensing Role in *Candida* Biofilm Development. **Genes (Basel)**, v. 11, n. 4, p. 444, 2020.
- RUDRAMURTHY, S. M.; CHAKRABARTI, A. Sporotrichosis: Update on Diagnostic Techniques. **Curr. Fungal Infect. Rep.**, v. 11, p. 134–140, 2017.
- SÁNCHEZ-HERRERA, R.; FLORES-VILLAVICENCIO, L. L.; PADILLA-GUERRERO, I.; BARBOSA-SABANERO, G.; SABANERO-LÓPEZ, M. Formación de biopelículas en el hongo patógeno *Sporothrix schenckii*: desarrollo, arquitectura y características bioquímicas. **Acta Univ.**, v. 24, n. 2, p. 11–15, 2014.
- SANCHOTENE, K. O.; BRANDOLT, T. M.; KLAFKE, G. B.; POESTER, V. R.; XAVIER, M. O. In vitro susceptibility of *Sporothrix brasiliensis*: Comparison of yeast and mycelial phases. **Med. Mycol.**, p. 1–8, 2017.
- SANDAI, D.; TABANA, Y. M.; EL OUWEINI, A.; AYODEJI, I. O. Resistance of *Candida albicans* biofilms to drugs and the host immune system. **Jundishapur J. Microbiol.**, v. 9, n. 11, p. e37385, 2016.
- SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, L. F.; TAYLOR, E. L. S.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; PIANETTI, G. A.; CÉSAR, I. C.; SANTOS, D. A. Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 5, p. 2553–2558, 2012.
- SAXENA, P.; JOSHI, Y.; RAWAT, K.; BISHT, R. Biofilms: architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms. **Indian J. Microbiol.**, v. 59, n. 1, p. 3–12, 2019.
- SCHECHTMAN, R. C.; HAY, R. J. Sporotrichosis in Brazil—an ongoing epidemic presenting

with skin lesions. **Dev. a Man. Best Pract. to Prev. early death from Ski. cancer albinism sub-Saharan Africa**, v. 15, n. 2, p. 19, 2019.

SCHENK, B. R. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to sporotrichia. **John Hopkins Hosp**, v. 9, p. 286–290, 1898.

SCORDINO, F.; PERNICE, I.; PASSO, C. LO; GALBO, R.; MEDICI, M. A.; CRISEO, G.; ROMEO, O. Antifungal susceptibilities of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Italy. **J. Biol. Res.**, v. 88, n. 1, p. 139–140, 2015.

SCORZONI, L.; SANGALLI-LEITE, F.; DE LACORTE SINGULANI, J.; COSTA-ORLANDI, C. B.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. **J. Microbiol. Methods**, v. 123, p. 68–78, 2016.

SEBAA, S.; BOUCHERIT-OTMANI, Z.; COURTOIS, P. Effects of tyrosol and farnesol on *Candida albicans* biofilm. **Mol. Med. Rep.**, v. 19, n. 4, p. 3201–3209, 2019.

SHINOGI, T.; MISAGO, N.; NARISAWA, Y. Cutaneous sporotrichosis with refractory and reinfectious lesions in a healthy female. **J. Dermatol.**, v. 31, n. 6, p. 492–496, 2004.

SIL, A.; ANDRIANOPOULOS, A. Thermally dimorphic human fungal pathogens — Polyphyletic pathogens with a convergent pathogenicity trait. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 5, n. 8, p. a019794, 2015.

SILVA, M. L. Q. **Efeito inibitório, in vitro, do iodeto de potássio e da miltefosina frente a cepas do complexo *Sporothrix schenckii* em biofilme nas formas filamentosa e leveduriforme.** Fortaleza, Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2017.

SIMITSOPOULOU, M.; CHATZIMOSCHOU, A.; ROILIDES, E. Biofilms and Antifungal Susceptibility Testing. In: ***Candida* Species: Methods and Protocols**. New York: Springer, 2016. p. 183–197.

SINGKUM, P.; MUANGKAEW, W.; SUWANMANEE, S.; PUMEESEAT, P.; WONGSUK, T.; LUPLERTLOP, N. Suppression of the pathogenicity of *Candida albicans* by the quorum-sensing molecules farnesol and tryptophol. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, p. 2012–2018, 2019.

SIZAR, O.; TALATI, R. Sporotrichosis (*Sporothrix schenckii*). In: **StatPearls [Internet]**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2019.

SONG, Y.; LI, S.; ZHONG, S.; LIU, Y.; YAO, L.; HUO, S. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. **J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.**, v. 27, n. 3, p. 313–318, 2013.

SOTO, S. M. Importance of biofilms in urinary tract infections: new therapeutic approaches. **Adv. Biol.**, v. 2014, n. 543974, p. 1–13, 2014.

STEWART, P. S.; WHITE, B.; BOEGLI, L.; HAMERLY, T.; WILLIAMSON, K. S.; FRANKLIN, M. J.; BOTHNER, B.; JAMES, G. A.; FISHER, S.; VITAL-LOPEZ, F. G.; WALLQVIST, A. Conceptual Model of Biofilm Antibiotic Tolerance That Integrates Phenomena of Diffusion, Metabolism, Gene Expression, and Physiology. **J. Bacteriol.**, v. 201, n. 22, p. e00307-19, 2019.

SUN, L.; ZHANG, C.; LI, P. Characterization, antibiofilm, and mechanism of action of novel PEG-stabilized lipid nanoparticles loaded with terpinen-4-ol. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, n. 24, p. 6150–6156, 2012.

TAKENAKA, M.; YOSHIZAKI, A.; UTANI, A.; NISHIMOTO, K. A survey of 165 sporotrichosis cases examined in Nagasaki prefecture from 1951 to 2012. **Mycoses**, v. 57, n. 5, p. 294–298, 2014.

TANG, M. M.; TANG, J. J.; GILL, P.; CHANG, C. C.; BABA, R. Cutaneous sporotrichosis: a six-year review of 19 cases in a tertiary referral center in Malaysia. **Int. J. Dermatol.**, v. 51, n. 6, p. 702–708, 2012.

TANINRATAPAT, N.; SRISUTTIYAKORN, C. Localized cutaneous sporotrichosis on face in healthy Thai female. **Mycopathologia**, v. 184, n. 4, p. 539–542, 2019.

TÉLLEZ, M. D.; BATISTA-DUHARTE, A.; PORTUONDO, D.; QUINELLO, C.; BONNE-HERNÁNDEZ, R.; CARLOS, I. Z. *Sporothrix schenckii* complex biology: Environment and fungal pathogenicity. **Microbiol. (United Kingdom)**, v. 160, n. 2014, p. 2352–2365, 2014.

TONON, C. C.; FRANCISCONI, R. S.; BORDINI, E. A. F.; HUACHO, P. M. M.; SARDI, J.

DE C. O.; SPOLIDORIO, D. M. P. Interactions between Terpinen-4-ol and Nystatin on biofilm of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Braz. Dent. J.**, v. 29, n. 4, p. 359–367, 2018.

TOURNU, H.; VAN DIJCK, P. *Candida* biofilms and the host: models and new concepts for eradication. **Int. J. Microbiol.**, v. 2012, p. 845352, 2012.

TRAVASSOS, L. R.; LLOYD, K. O. *Sporothrix schenckii* and related species of Ceratocystis. **Microbiol. Rev.**, v. 44, n. 4, p. 683, 1980.

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

VALENTÍN, A.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; FERNANDEZ-RIVERO, M. E.; TORMOMAS, M. A.; MARTÍNEZ, J. P. *In vitro* activity of anidulafungin in combination with amphotericin B or voriconazole against biofilms of five *Candida* species. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 71, n. 17, p. 3449–3452, 2016.

VETTORATO, R.; HEIDRICH, D.; FRAGA, F.; RIBEIRO, A. C.; PAGANI, D. M.; TIMOTHEO, C.; AMARO, T. G.; VETTORATO, G.; SCROFERNEKER, M. L. Sporotrichosis by *Sporothrix schenckii sensu stricto* with itraconazole resistance and terbinafine sensitivity observed *in vitro* and *in vivo*: Case report. **Med. Mycol. Case Rep.**, v. 19, p. 18–20, 2018.

VIANA, P. G.; FIGUEIREDO, A. B. F.; GREMIÃO, I. D. F.; DE MIRANDA, L. H. M.; DA SILVA ANTONIO, I. M.; BOECHAT, J. S.; DE SÁ MACHADO, A. C.; DE OLIVEIRA, M. M. E.; PEREIRA, S. A. Successful Treatment of Canine Sporotrichosis with Terbinafine: Case Reports and Literature Review. **Mycopathologia**, v. 183, n. 2, p. 471–478, 2018.

VILA, T.; ISHIDA, K.; SEABRA, S. H.; ROZENTAL, S. Miltefosine inhibits *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* spp. biofilms and impairs the dispersion of infectious cells. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 48, n. 5, p. 512–520, 2016.

VILA, T. V. M.; ROZENTAL, S. Biofilm Formation as a Pathogenicity Factor of Medically

Important Fungi. In: **Fungal Pathogenicity**. London: InTech, 2016.

VINAY, K.; BHATTACHARJEE, R.; BISHNOI, A.; CHATTERJEE, D.;  
RUDRAMURTHY, S.; DOGRA, S. Dermatoscopic features of cutaneous sporotrichosis. **J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.**, 2020.

VISMER, H. F.; HULL, P. R. Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in Gauteng, South Africa. **Mycopathologia**, v. 137, n. 3, p. 137–143, 1997.

WAHAB, A. A.; DING, C. H.; YUSOFF, N. H. M. Lymphocutaneous sporotrichosis in a patient with underlying systemic lupus erythematosus. **J. Med.**, v. 21, n. 1, p. 59–61, 2020.

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

WALLER, S. B.; DALLA LANA, D. F.; QUATRIN, P. M.; FERREIRA, M. R. A.;  
FUENTEFRIA, A. M.; MEZZARI, A. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. **Brazilian J. Microbiol.**, 2020.

WANG, X.; WANG, Y.; ZHOU, Y.; WEI, X. Farnesol induces apoptosis-like cell death in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, v. 106, n. 5, p. 881–888, 2014.

WATERS, V.; RATJEN, F. Standard versus biofilm antimicrobial susceptibility testing to guide antibiotic therapy in cystic fibrosis. **Cochrane Libr.**, 2017.

WIESMANN, V.; FRANZ, D.; HELD, C.; MÜNZENMAYER, C.; PALMISANO, R.;  
WITTENBERG, T. Review of free software tools for image analysis of fluorescence cell micrographs. **J. Microsc.**, v. 257, n. 1, p. 39–53, 2015.

WILSON, C.; LUKOWICZ, R.; MERCHANT, S.; VALQUIER-FLYNN, H.; CABALLERO, J.; SANDOVAL, J.; OKUOM, M.; HUBER, C.; BROOKS, T. D.; WILSON, E. Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth: A mini-review. **Res. Rev. J. Eng. Technol.**, v. 6, n. 4, 2017.



WONGSUK, T.; LUPLERTLOP, N.; SUKPHOPETCH, P. Effect of Quorum Sensing Molecules on *Aspergillus fumigatus*. **Walailak J. Sci. Technol.**, v. 17, n. 3, p. 348–358, 2020.

WONGSUK, T.; PUMEEESAT, P.; LUPLERTLOP, N. Fungal quorum sensing molecules: role in fungal morphogenesis and pathogenicity. **J. Basic Microbiol.**, v. 56, n. 5, p. 440–447, 2016.

XIA, J.; QIAN, F.; XU, W.; ZHANG, Z.; WEI, X. In vitro inhibitory effects of farnesol and interactions between farnesol and antifungals against biofilms of *Candida albicans* resistant strains. **Biofouling**, v. 33, n. 4, p. 283–293, 2017.

YADAV, E.; RAO, R. A promising bioactive component terpinen-4-ol: A review. **Int. J. Pharmacogn.**, v. 3, n. 8, p. 336–345, 2016.

ZENGIN, H.; BAYSAL, A. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17773–17798, 2014.

ZHANG, J.; FENG, T.; WANG, J.; WANG, Y.; ZHANG, X.-H. The Mechanisms and Applications of Quorum Sensing (QS) and Quorum Quenching (QQ). **J. Ocean Univ. China**, v. 18, n. 6, p. 1427–1442, 2019a.

ZHANG, M.; LI, F.; LI, R.; GONG, J.; ZHAO, F. Fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*, *Sporothrix schenckii*, and *Sporothrix brasiliensis* based on multiplex real-time PCR. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 2, 2019b.

ZHANG, M.; LI, F.; GONG, J.; YANG, X.; ZHANG, J.; ZHAO, F. Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction for fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*. **Med. Mycol.**, v. 58, n. 1, p. 61–65, 2020.

ZHANG, Y.; HAGEN, F.; STIELOW, B.; RODRIGUES, A. M.; SAMERPITAK, K.; ZHOU, X.; FENG, P.; YANG, L.; CHEN, M.; DENG, S. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. **Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi**, v. 35, p. 1–20, 2015.

ZHANG, Z.; HOU, B.; WU, Y. Z. Two - component histidine kinase DRK1 is required for

pathogenesis in *Sporothrix schenckii*. **Mol. Med. Rep.**, v. 17, p. 721–728, 2018.

ZHOU, X.; RODRIGUES, A. M.; FENG, P.; DE HOOG, G. S. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Fungal Divers.**, v. 66, n. 1, p. 153–165, 2014.

ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **J. Bacteriol.**, v. 46, n. 1, p. 39, 1943.

ZOBELL, C. E.; ALLEN, E. C. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. **J. Bacteriol.**, v. 29, n. 3, p. 239, 1935.

ZURABIAN, R.; HERNÁNDEZ, F. H. Sporotrichosis: the most frequent subcutaneous mycosis in Mexico. **Rev. la Fac. Med. UNAM**, v. 62, n. 5, p. 48–55, 2019.

## **APÊNDICES**

## Research Article

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)



Future  
MICROBIOLOGY

## Terpinen-4-ol inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents

Raimunda SN Brilhante<sup>1</sup>, Vandbergue S Pereira<sup>1</sup>, Jonathas S Oliveira<sup>1</sup>, Anderson M Rodrigues<sup>2</sup>, Zoilo P de Camargo<sup>2</sup>, Waldemiro A Pereira-Neto<sup>1</sup>, Nilberto RF Nascimento<sup>3</sup>, Débora SCM Castelo-Branco<sup>1</sup>, Rossana A Cordeiro<sup>1</sup>, José JC Sidrim<sup>\*,1</sup> & Marcos FG Rocha<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Department of Pathology & Legal Medicine, Federal University of Ceará. Rua Coronel Nunes de Melo, 1315 – Rodolfo Teófilo – CEP: 60430-275, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>2</sup>Cellular Biology Division, Department of Microbiology, Immunology & Parasitology, Federal University of São Paulo, Rua Botucatu, 862, 6th floor, Medical Sciences Building, CEP: 04023-062, São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup>Postgraduate Program in Veterinary Sciences, College of Veterinary, State University of Ceará. Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, CEP: 60714-903, Fortaleza, Ceará, Brazil

\*Author for correspondence: Fax: +55 853 295 1736; [jjcsidrim@gmail.com](mailto:jjcsidrim@gmail.com)

**Aim:** This study investigated the effect of terpinen-4-ol against *Sporothrix schenckii* complex and its interactions with antifungals. **Materials & methods:** The antifungal activity of terpinen-4-ol was evaluated by broth microdilution. The potential effect on cellular ergosterol concentration was evaluated by spectrophotometry. The antibiofilm activity was evaluated by violet crystal staining and XTT reduction assay. The potential pharmacological interactions with antifungals were evaluated by the checkerboard assay. **Results:** terpinen-4-ol (T-OH) showed minimal inhibitory concentrations ranging from 4 to 32 mg/l decreasing cellular ergosterol content and presented a SMIC ranging from 64 to 1024 mg/l for *Sporothrix* spp. The combinations of T-OH with itraconazole or terbinafine were synergistic. **Conclusion:** T-OH has antifungal activity against *Sporothrix* spp. and acts synergistically with standard antifungals.

First draft submitted: 17 May 2019; Accepted for publication: 6 August 2019; Published online: 18 October 2019

**Keywords:** antifungals • biofilm • ergosterol • planktonic • *Sporothrix* • synergism • terpinen-4-ol

Sporotrichosis is a subcutaneous infection caused by a dimorphic fungi belonging to *Sporothrix schenckii* complex [1]. This is the most common subcutaneous fungal infection in the world with high prevalence in Latin America, India, Australia, South Africa, China and Japan [2].

Although the planktonic growth form of *Sporothrix* spp. has been extensively studied, both in its filamentous and yeast forms, it has been demonstrated in recent years that these fungi, like other microorganisms, are capable for forming biofilms. While in their filamentous planktonic form they grow as hyaline hyphae with lateral and terminals conidia in simpodial arrangement, their yeast form they present as oval cells, sometimes elongated, and with budding [3]. Once they are organized in biofilms, they begin to present the production of extracellular polymer matrix [4,5]. The formation of biofilms of *Sporothrix* spp., in their filamentous or yeast form, occurs after the initial adhesion of the cells to a surface and ensues with cell multiplication and extracellular matrix production until the formation of the mature biofilm. The filamentous form is characterized by the formation of multiple layers of interlaced hyphae with conidia embedded in a dense layer of the extracellular polymer matrix, while the yeast form of these fungi form biofilms composed of multiple blastoconidia covered by the extracellular polymeric matrix. Although they have distinct morphologies, both biofilms have low responsiveness to antifungal drugs [4,5].

The pharmacological arsenal available to treat sporotrichosis is still scarce, with itraconazole as the drug of choice, potassium iodide and terbinafine as therapeutic alternatives for cutaneous forms of the disease, and amphotericin B for the treatment of extracutaneous and disseminated forms [6]. This limited therapeutic arsenal, associated with the emergence of the resistant phenotypes of *Sporothrix* spp. leading to an increasing number of refractory [7–10], has driven the search for molecules effective against *Sporothrix* spp. [11]. In this respect, evaluation of the antimicrobial

Future  
Medicine

properties of natural products has attracted much attention [12,13]. Many natural products have already demonstrated antifungal activity against the species of *Sporothrix* spp. such as *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* extracts [14], essential oil of *Origanum vulgare* Linnaeus [15], curcumin [16] and terpenes [17]. An example of terpene compounds is terpinen-4-ol (T-OH), a monoterpene present in the essential oil of *Melaleuca alternifolia*, which exhibits antifungal properties *in vitro* against filamentous, yeast and dimorphic fungi [18–20].

In a previous study, our research group investigated the effect of T-OH on the planktonic growth of the filamentous form of *Sporothrix* species [17]. Keeping on this line of research, this study investigated the effects of T-OH on planktonic growth and ergosterol concentration of *Sporothrix* spp. yeast cells, its effects on filamentous and yeast biofilms, and the result of its interaction with conventional antifungals used to treat sporotrichosis.

## Material & methods

### Microorganisms

Fifteen strains of clinical isolates belonging to the *S. schenckii* complex were used: six *Sporothrix brasiliensis*, three *Sporothrix globosa*, three *Sporothrix mexicana* and three *Sporothrix schenckii sensu stricto*. The isolates were obtained from the culture collection of the Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) of Federal University of Ceará, Brazil. These strains were previously characterized at the species level by sequencing the calmodulin locus region [21,22]. For experimentation with the filamentous form, cultures were grown on potato dextrose agar (Himedia, Mumbai, India) and incubated at 28°C for 7 days. To obtain the yeast form, cultures were perfused in brain and heart infusion medium (BHI, Himedia) at pH 7.8, supplemented with 2% glucose and incubated at 37°C at 120 r.p.m orbital rotation for 7 days [23]. In addition, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *Candida krusei* ATCC 6258 strains were used as controls in the antifungal susceptibility experiments in planktonic cells.

### Drugs

T-OH (Sigma-Aldrich, MO, USA) was diluted in DMSO [18] at stock concentrations of 20,000 mg/l. Amphotericin B (AMB; Sigma-Aldrich), itraconazole (ITC; Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium) and terbinafine (TRB; Sigma-Aldrich) were solubilized in DMSO as recommended in document M38-A2 [24], at a concentration of 1600 mg/l. All drugs were stored at -20°C until the time of use.

### Antifungal susceptibility test in planktonic yeast cells of *Sporothrix* spp.

Susceptibility tests of *Sporothrix* spp. (n = 15) were carried out in 96-well microplates using the broth microdilution technique, according to Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) document M27-A3 [25], with adaptations. The drugs were tested at final concentrations of 1–1024 mg/l (T-OH) and 0.03–16 mg/l (AMB, ITC and TRB). Inocula were prepared in saline solution and adjusted to a final concentration of  $0.5\text{--}2.5 \times 10^3$  CFU/ml in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich), buffered to pH 7.0 with 0.165 M MOPS (Sigma-Aldrich). The microplates were incubated at 37°C for 96 h. The MICs were defined as the lowest concentration capable of inhibiting 100% (AMB and ITC) and 80% (T-OH and TRB) of visual fungal growth compared with the control cultures free of the drug. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 were used as quality controls in the experiments.

The minimum fungicidal concentration (MFC) of T-OH was determined by sowing 100 µl of the contents of all wells lacking visual fungal growth in potato dextrose agar, incubated at 25°C for 7 days. The MFC was considered to be the lowest concentration where no growth of fungus colonies was observed [26]. The experiments were conducted in duplicate at two different times.

### Influence of T-OH on the cellular ergosterol

Total sterols were extracted as described by Moran *et al.* [27] and Brillhante *et al.* [18] with adaptations. Extraction was performed after exposure of the T-OH, ITC (positive control) and AMB (negative control) at MIC, MIC/2, MIC/4 and MIC/8, for 72 h (filamentous form) and 96 h (yeast form). After exposure, the inocula were transferred to Eppendorf tubes and centrifuged at  $12,000 \times g$  for 5 min and the cell pellets were suspended in 500 µl of alcoholic KOH (solution of KOH 20% [w/v] in alcohol 60% [v/v]) and then incubated for 1 h at 95°C in a water bath. After this time, 600 µl of n-hexane was added to isolate the sterols. The Eppendorf tubes were then centrifuged at  $12,000 \times g$  for 1 min, and the entire upper organic layer containing the sterols was mixed with 500 µl of n-hexane. Absorbance readings were performed at 295 nm and ergosterol quantification was performed by comparison with a previously determined ergosterol curve (Sigma-Aldrich, Germany) [18]. All experiments were performed in duplicate.

### Biofilm formation

For the formation of biofilms, the methods described by Brillhante *et al.* [5] were used. Aliquots of 200  $\mu$ l of fungal suspension at  $1 \times 10^6$  conidia/ml (filamentous form) or  $2 \times 10^5$  cells/ml (yeast form) prepared in RPMI 1640 medium were added to 96-well microplates and incubated at 35°C (filamentous form) or 37°C (yeast form) for 24 h for cell adhesion. After this period, the wells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), and 200  $\mu$ l of RPMI medium was added and the microplates were incubated again for another 96 h, under the same conditions, for formation and maturation of the biofilms.

### Biofilm antifungal susceptibility test

Once formed, the biofilms were washed with PBS, and 200  $\mu$ l aliquots of RPMI 1640 medium containing serial dilutions of each drug were added to the microplates, which were then incubated at 35°C (filamentous form) or 37°C (yeast form) for 72 h. Drug concentrations ranged from 16 to 1024 mg/l for T-OH and 8 to 256 mg/l for AMB, ITC and TRB [5]. After exposure, biofilm susceptibility to drugs was assessed by quantification of biomass by crystal violet staining and metabolic activity by the XTT reduction assay (Sigma-Aldrich), as described by Brillhante *et al.* [4].

The XTT reduction assay is based on the ability of mitochondrial dehydrogenases present in viable cells to convert this tetrazole salt into its reduced form, formazan, which upon reacting with menadione produces orange coloring that can be quantified by spectrophotometry [4]. The XTT assays were performed using stock solutions of XTT (1 mg/ml in PBS) and menadione (1 mM in ethanol). A total of 125  $\mu$ l of XTT solution and 6  $\mu$ l of menadione solution were added to all wells containing biofilm and after 3 h of incubation at 35°C, in the dark, the color change was measured with a spectrophotometer at 492 nm.

The sessile MIC (SMIC) was determined as the lowest concentration capable of causing 50% (SMIC50) and 80% (SMIC80) inhibition of metabolic activity of the biofilm, when compared with the metabolic activity of drug-free control [28]. The experiments were conducted in duplicate at two different times.

### Biofilm structure & morphology

The effects of T-OH on the structure and morphology of biofilms were evaluated using a strain representative of *S. brasiliensis*. Biofilms were formed on Thermanox™ slides (Thermo Fisher Scientific, NY, USA), treated with the T-OH SMIC<sub>80</sub>, as described above, and evaluated by scanning electron microscopy and laser scanning confocal microscopy as described by Brillhante *et al.* [5].

### Interaction between T-OH & antifungals in planktonic cells

Initially, we evaluated planktonic susceptibility of *Sporothrix* spp. in the filamentous form against the antifungals AMB, ITC and TRB in 96-well microplates using the broth microdilution technique, according to CLSI document M38-A2 [24], with adaptations. The strains were classified as wild or non-wild type against AMB, ITC and TRB according to the epidemiological cutoff points proposed by Espinel-Ingroff *et al.* [29].

For the evaluation of interactions between T-OH and antifungals, three strains of each species of *Sporothrix* were selected, and strains of *S. brasiliensis* were selected by its classification as non-wild type strains [29]. Both the filamentous and yeast forms were used, applying the microdilution method by checkerboard [5]. Combinations of varying concentrations of T-OH from 4 to 256 mg/l for filamentous form and from 0.5 to 32 mg/l for the yeast form of *Sporothrix* spp. were combined with AMB, ITC or TRB (0.007–8 mg/l). Inocula were prepared to a final concentration of  $0.4\text{--}5 \times 10^4$  CFU/ml (filamentous form) or  $0.5\text{--}2.5 \times 10^3$  CFU/ml (yeast form) in RPMI 1640 medium as described above. The microplates were incubated at 35°C for 72 h (filamentous form) or 37°C for 96 h (yeast form) and the MICs were defined as previously described.

The MIC values obtained were used to determine the fractional inhibitory concentration index (FICI). Interactions were defined as synergistic when  $FICI \leq 0.5$ , indifferent when  $0.5 < FICI \leq 4$  and antagonistic when  $FICI \geq 4$  [30].

### Interaction between T-OH & antifungals on biofilms

For the evaluation of the interactions between T-OH and antifungals against *S. schenckii* complex biofilms, three strains of each *Sporothrix* species were selected, and *S. brasiliensis* strains were selected by its classification as nonwild-type strains for antifungal susceptibility cells [29]. The microdilution checkerboard method described by Valentín *et al.* [31] and adapted by Brillhante *et al.* [5] was used.

**Table 1. Minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration of antifungals and terpinen-4-ol against planktonic cells of the yeast form of *Sporothrix schenckii* complex.**

Specie (n)	Antifungals			Terpinen-4-ol	
	Amphotericin B	Itraconazole	Terbinafine	MIC	MFC
	MIC	MIC	MIC		
<b><i>Sporothrix brasiliensis</i></b>					
CEMM 05-3-050	0.25	0.25	0.031	16	64
CEMM 05-3-075	0.125	0.5	0.125	4	64
CEMM 05-3-078	0.5	0.25	0.031	32	128
CEMM 05-3-087	0.063	0.5	0.031	4	64
CEMM 05-3-088	0.25	0.25	0.125	8	32
<b><i>Sporothrix globosa</i></b>					
CEMM 05-4-004	0.25	0.25	0.031	8	128
CEMM 05-4-005	0.031	0.031	0.031	16	64
CEMM 05-4-006	0.063	0.25	0.125	16	128
<b><i>Sporothrix mexicana</i></b>					
CEMM 05-3-101	0.5	0.25	0.031	16	64
CEMM 05-4-008	0.25	0.25	0.125	16	256
CEMM 05-4-009	0.5	1	0.125	8	128
<b><i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i></b>					
CEMM 05-3-090	0.063	0.5	0.031	8	64
CEMM 05-3-048	0.125	0.5	0.125	16	128
CEMM 05-4-002	0.063	0.25	0.125	16	128

CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica; MFC: Minimum fungicidal concentration (mg/l); MIC: Minimum inhibitory concentration.

Biofilms were formed as previously described and exposed to combined concentrations of the drugs, using concentrations of 16–1024 mg/l T-OH for the filamentous form and 4–256 mg/l for yeast form of *Sporothrix* spp., with AMB, ITC or TRB (0.25–256 mg/l). The FICI for each combination was determined using the SMIC<sub>80</sub> values of the isolated or combined drugs [32] and interpreted as described previously [30]. The experiments were conducted in duplicate at two different times.

### Statistical analysis

All assays were performed in triplicate at two different moments. For data with normal distribution and similar variances, Student's *t*-test or analysis of variance (ANOVA) was used, followed by Tukey's post-*hoc* test. As for data with asymmetry, Wilcoxon's or Friedman's nonparametric tests were used, followed by Dunn's post-*hoc* test. The maximum significance value adopted for affirmative conclusions was 5%. Statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, CA, USA).

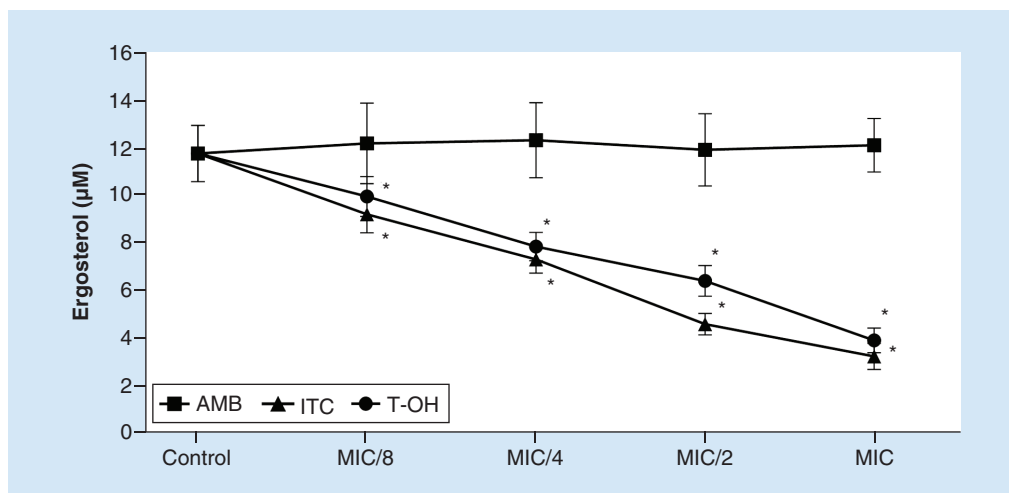
## Results

### Antifungal susceptibility of planktonic cells

T-OH showed antifungal activity against the yeast form of *Sporothrix* spp., with different MIC and MFC values (Table 1). The MIC values of T-OH for yeast form varied from 4 to 32 mg/l for *S. brasiliensis* and from 8 to 16 mg/l for the other species. In turn, MFC values ranging from 32 to 128 mg/l were obtained for *S. brasiliensis*, from 64 to 128 mg/l for *S. globosa* and *S. schenckii s. str.* and from 64 to 256 mg/l for *S. mexicana*. The antifungal values for *Sporothrix* spp. ranged from 0.06 to 0.5 mg/l for AMB, from 0.03 to 1 mg/l for ITC and from 0.03 to 0.13 mg/l for TRB.

### Influence of T-OH on the cellular ergosterol

Exposure of *Sporothrix* spp., in the yeast form, to different concentrations (MIC, MIC/2, MIC/4 and MIC/8) of T-OH resulted in a decrease ( $p < 0.05$ ) in the amount of ergosterol extracted from the cells' fungal compared with the control (Figure 1). Similar results were observed for ITC (positive control) exposure, whereas exposure to AMB (negative control) did not cause changes in ergosterol concentration.



**Figure 1.** Quantification of the cellular ergosterol content of *Sporothrix* spp. after exposure to different concentrations of terpinen-4-ol. Reading performed at 295 nm to detect ergosterol concentration, using amphotericin B as negative control and itraconazole as a positive control for altered ergosterol content. Results expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

#### Effects of exposure of *Sporothrix* biofilms to T-OH

Exposure of mature biofilms of *Sporothrix* spp. to T-OH caused reductions in the biomass and metabolic activity of biofilms, for both the filamentous and yeast forms (Figure 2).

For filamentous biofilms, biomass and metabolic activity significant reductions were observed from the concentration of 128–1024 mg/l to T-OH ( $p < 0.05$ ) (Figure 2A & B), with SMIC<sub>50</sub> of 256 mg/l for *S. brasiliensis* and 128 mg/l for the other species. SMIC<sub>80</sub> was defined as 512 mg/l for *S. schenckii* s. str. and 1024 mg/l for the other species.

For yeast biofilms, significant reductions in biomass and metabolic activity were observed at concentrations starting from 64 mg/l ( $p < 0.05$ ), with SMIC<sub>50</sub> <64 mg/l for *S. brasiliensis* and *S. schenckii* s. str., and 128 mg/l for *S. globosa* and *S. mexicana*. For SMIC<sub>80</sub>, there were also variations among species, with values of 64 mg/l for *S. brasiliensis* and *S. schenckii* s. str., and 512 mg/l for *S. globosa* and *S. mexicana*.

#### Effects of T-OH on the structure & morphology of biofilms

Through confocal scanning laser microscopy and scanning electron microscopy, it was possible to study the biofilm structure of *S. brasiliensis* in its filamentous and yeast forms before and after exposure to T-OH in the SMIC<sub>80</sub>.

The biofilm of the filamentous form of *Sporothrix* spp., exposed to T-OH (1024 mg/l), had reduced density of fungal cells (Figure 3B & F). The biofilm was mostly composed of dead cells or those with membrane damage (Figure 3B). As for the biofilm of the yeast form of this fungus, exposed to T-OH (64 mg/l), it was possible to observe a reduction in biomass and thickness, and loss of structural organization (Figure 3H), accompanied by reduction in viable cell density (Figure 3D), as previously observed in untreated biofilms (Figure 3C & G).

#### Interactions between T-OH & antifungals in planktonic cells

The MIC values of the antifungals, either alone or combined with T-OH, as well as the FICI obtained for the filamentous and yeast forms of *Sporothrix* spp., against planktonic growth are shown in Table 2.

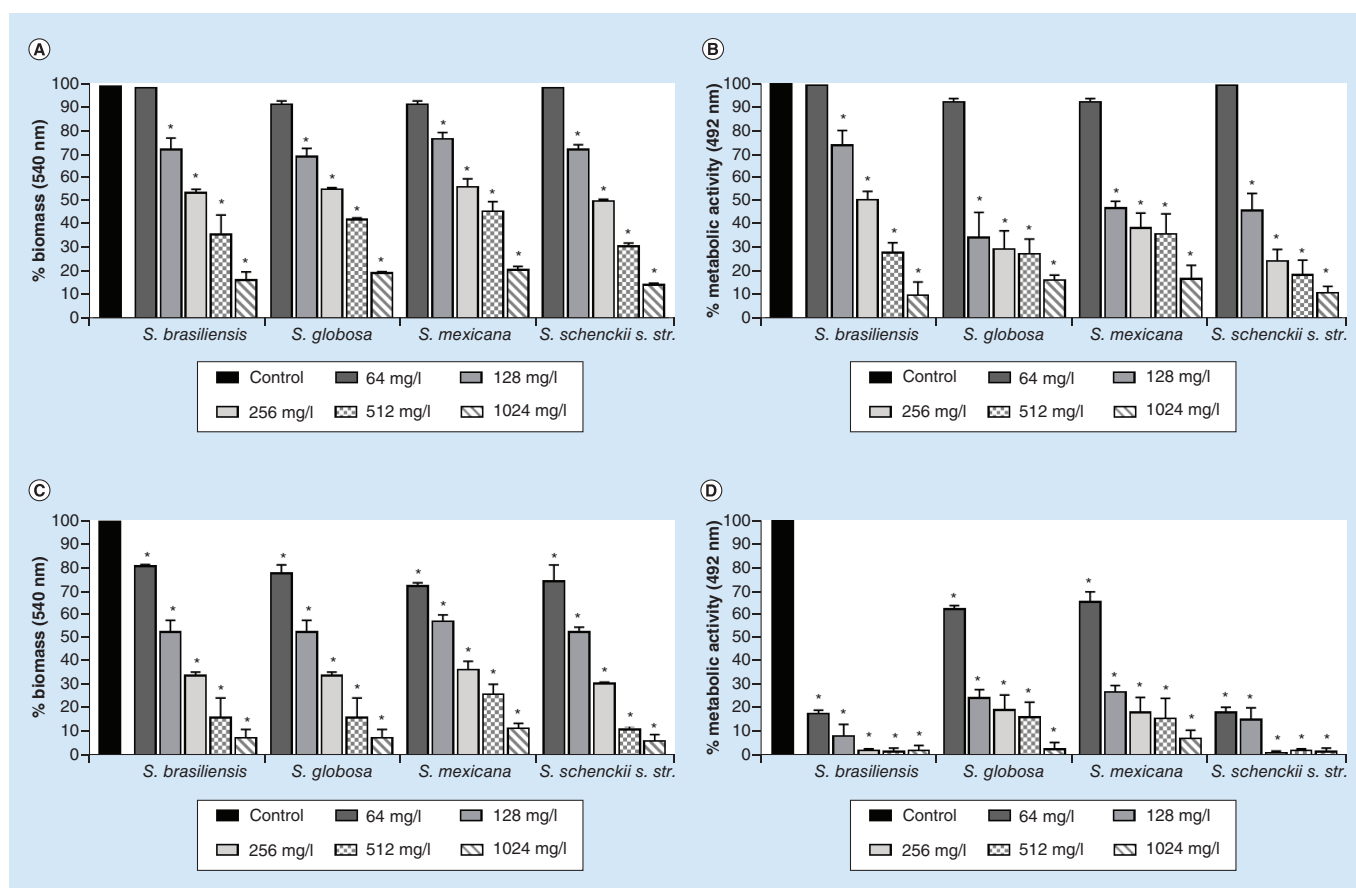
The combinations with ITC were synergistic for the filamentous and yeast forms of *S. brasiliensis*, *S. mexicana* and *S. schenckii* s. str., while for *S. globosa*, synergistic interactions were observed in the three strains evaluated in the filamentous form and in two of the three strains evaluated in the yeast form, the third one being indifferent to the drug combination. Combinations of T-OH with TRB were classified as synergistic for the four evaluated species, in both their filamentous and yeast forms, except for a strain of *S. mexicana* in its yeast form. The combinations of T-OH and AMB were indifferent to all strains tested, in both morphological presentations of fungi.



**Table 2. Fractional inhibitory concentration index for the combination of terpinen-4-ol with amphotericin B, itraconazole and terbinafine against planktonic cells of *Sporothrix* spp., in filamentous and yeast forms.**

Specie	Form	MIC (mg/l)											
		Isolated				Combined				Fractional inhibitory concentration index			
		T-OH	AMB	ITC	TRB	T-OH + AMB	T-OH + ITC	T-OH + TRB	T-OH + TRB	T-OH + AMB	T-OH + ITC	T-OH + TRB	
<b><i>Sporothrix brasiliensis</i></b>													
CEMM 05-3-050	F	128	4	2	0.125	32/2	16/0.5	16/0.031	0.75 <sup>I</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>
	Y	16	0.25	0.25	0.031	16/0.25	4/0.063	4/0.008	2 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>
CEMM 05-3-075	F	16	2	2	0.063	4/2	4/0.25	4/0.016	1.25 <sup>I</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>
	Y	4	0.125	0.5	0.125	4/0.125	1/0.125	1/0.031	2 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>
CEMM 05-3-088	F	16	2	2	0.063	2/1	4/0.25	4/0.008	0.625 <sup>I</sup>	0.188 <sup>S</sup>	0.188 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>
	Y	8	0.25	0.25	0.125	8/0.25	2/0.063	1/0.031	2 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>
<b><i>Sporothrix globosa</i></b>													
CEMM 05-4-004	F	32	0.5	2	0.063	4/0.25	8/0.25	8/0.008	0.625 <sup>I</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>
	Y	8	0.25	0.25	0.031	8/0.25	2/0.031	2/0.008	2 <sup>I</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-005	F	16	2	1	0.063	2/1	2/0.25	4/0.008	0.625 <sup>I</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>
	Y	16	0.031	0.031	0.031	32/0.063	4/0.016	4/0.008	3 <sup>I</sup>	0.75 <sup>I</sup>	0.75 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-006	F	16	1	0.5	0.125	4/1	4/0.125	4/0.031	1.25 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>
	Y	16	0.063	0.25	0.125	16/0.063	2/0.031	2/0.031	2 <sup>I</sup>	0.25 <sup>S</sup>	0.25 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>
<b><i>Sporothrix mexicana</i></b>													
CEMM 05-3-101	F	64	1	0.5	0.125	16/0.5	16/0.125	16/0.031	0.75 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>
	Y	16	0.5	0.25	0.031	32/1	4/0.016	4/0.031	3 <sup>I</sup>	0.313 <sup>S</sup>	0.313 <sup>S</sup>	1.25 <sup>I</sup>	1.25 <sup>I</sup>
CEMM 05-4-008	F	32	4	2	0.25	8/4	8/0.5	4/0.063	1.25 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>
	Y	16	0.25	0.25	0.125	16/0.25	2/0.016	2/0.031	2 <sup>I</sup>	0.188 <sup>S</sup>	0.188 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-009	F	16	1	2	0.125	4/1	4/0.5	4/0.031	1.25 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>
	Y	8	0.5	1	0.125	4/0.25	2/0.125	2/0.008	1 <sup>I</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.313 <sup>S</sup>	0.313 <sup>S</sup>
<b><i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i></b>													
CEMM 05-3-090	F	64	0.25	1	0.25	16/0.125	16/0.25	8/0.063	0.75 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>
	Y	8	0.063	0.5	0.031	8/0.063	2/0.125	1/0.008	2 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>
CEMM 05-3-048	F	32	1	0.5	0.125	8/2	8/0.125	8/0.031	2.25 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>
	Y	16	0.125	0.5	0.125	32/0.125	4/0.063	2/0.031	3 <sup>I</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>
CEMM 05-4-002	F	64	1	0.5	0.125	16/1	8/0.063	16/0.031	1.25 <sup>I</sup>	0.25 <sup>S</sup>	0.25 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>
	Y	16	0.063	0.25	0.125	32/0.125	4/0.031	4/0.031	3 <sup>I</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>

AMB: Amphotericin B; ITC: Itraconazole; CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica; F: Filamentous form; I: Indifference; S: Synergism; T-OH: Terpinen-4-ol; TRB: Terbinafine; Y: Yeast form.



**Figure 2. Inhibitory effect of terpinen-4-ol against *Sporothrix* spp.** Percentage of biomass (A & C) and metabolic activity (B & D) of biofilms of *Sporothrix* spp. in filamentous (A & B) and yeast (C & D), exposed to different concentrations of terpinen-4-ol. Results expressed by mean  $\pm$  standard deviation.

\*Statistical differences in relation to control (free drug growth).

### Interactions between T-OH & biofilm antifungal agents

The SMIC<sub>80</sub> values for the antifungals either isolated or combined with T-OH, as well as the FICI obtained for the combination of the drugs against the biofilms of the filamentous and yeast forms of *Sporothrix* spp., are shown in Table 3.

T-OH presented synergistic interactions with ITC for *S. brasiliensis* and *S. schenckii s. str.* species in both filamentous and yeast forms, as well as for a strain of *S. globosa* and *S. mexicana* strain in filamentous form, and two strains of *S. globosa* and one of *S. mexicana* in yeast form. As observed in the interaction test in planktonic cells, the combinations of T-OH with TRB showed synergism for all strains studied. The association between T-OH and AMB was not synergic against filamentous and yeast biofilms of the four *Sporothrix* species evaluated.

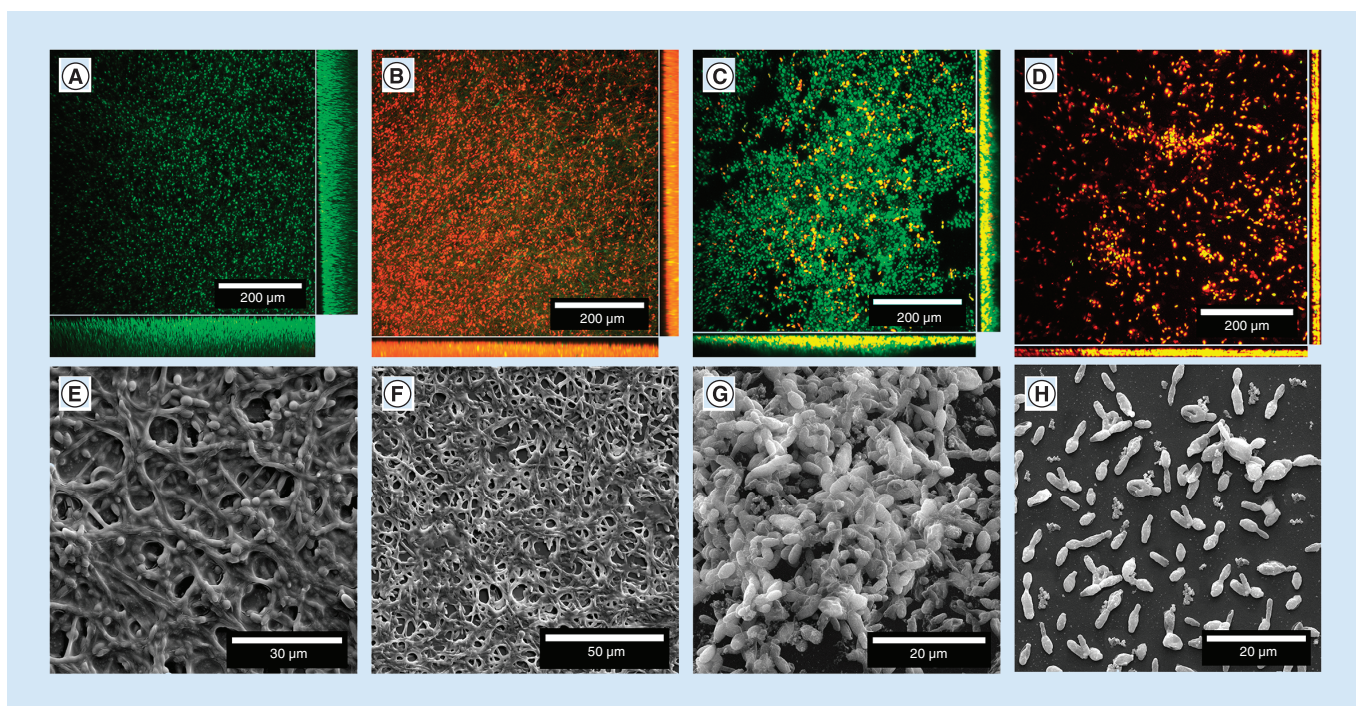
### Discussion

T-OH is a monoterpene that has antimicrobial activity reported both in *in vitro* and *in vivo* studies [33,34]. The antifungal effects of T-OH were previously described by Tonon *et al.* [35] against species of *Candida* (MIC: 4530 mg/l). In addition, previous studies carried out by our research group showed that T-OH has antifungal activity against the filamentous (MIC: 20–1420 mg/l) and yeast (MIC: 40–350 mg/l) forms of *Histoplasma capsulatum* and the filamentous forms of *Coccidioides posadasii* (MIC: 350–1420 mg/l) [18] and *Sporothrix* spp. (MIC: 87.9–1429.8 mg/l) [17]. In this article, we present the evaluation of the antifungal activity of T-OH and its effects on the ergosterol content in planktonic yeast cells of *Sporothrix* spp., its antifungal potential against biofilms formed from filamentous and yeast forms of *Sporothrix* spp., and its interactions with the antifungal drugs used in the treatment of sporotrichosis.

**Table 3. Fractional inhibitory concentration index for the combination of terpinen-4-ol with amphotericin B, itraconazole and terbinafine against biofilms of *Sporothrix* spp., in filamentous and yeast forms.**

Specie	Form	MIC (mg/l)											
		Isolated				Combined				Fractional inhibitory concentration index			
		T-OH	AMB	ITC	TRB	T-OH + AMB	T-OH + ITC	T-OH + TRB	T-OH + TRB	T-OH + AMB	T-OH + ITC	T-OH + TRB	
<b><i>Sporothrix brasiliensis</i></b>													
CEMM 05-3-050	F	1024	128	128	16	256/128	256/32	256/4	1.25 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	
	Y	64	64	16	8	16/64	16/4	16/2	1.25 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	
CEMM 05-3-075	F	1024	128	128	8	128/128	128/16	128/2	1.125 <sup>I</sup>	0.25 <sup>S</sup>	0.25 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	
	Y	64	16	64	16	8/16	8/8	16/4	1.125 <sup>I</sup>	0.25 <sup>S</sup>	0.25 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	
CEMM 05-3-088	F	1024	32	128	64	512/16	256/32	256/16	1 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	
	Y	64	32	128	8	32/16	16/32	16/2	1 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	
<b><i>Sporothrix globosa</i></b>													
CEMM 05-4-004	F	2048	64	128	8	1024/64	1024/32	512/2	1.5 <sup>I</sup>	0.75 <sup>S</sup>	0.75 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	
	Y	512	64	32	16	256/64	128/8	128/4	1.5 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	
CEMM 05-4-005	F	2048	128	128	16	512/64	512/32	256/4	0.75 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	
	Y	256	4	32	16	64/2	64/8	64/4	0.75 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	
CEMM 05-4-006	F	2048	64	64	16	1024/128	1024/32	512/4	2.5 <sup>I</sup>	1 <sup>I</sup>	1 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	
	Y	256	16	64	8	128/16	64/32	64/1	1.5 <sup>I</sup>	0.75 <sup>I</sup>	0.75 <sup>I</sup>	0.375 <sup>S</sup>	
<b><i>Sporothrix mexicana</i></b>													
CEMM 05-3-101	F	2048	128	64	16	512/256	512/64	256/4	2.25 <sup>I</sup>	1.25 <sup>I</sup>	1.25 <sup>I</sup>	0.375 <sup>S</sup>	
	Y	256	32	32	16	64/32	64/32	64/4	1.25 <sup>I</sup>	1.25 <sup>I</sup>	1.25 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	
CEMM 05-4-008	F	2048	128	128	64	1024/64	512/32	512/8	1 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	
	Y	512	16	32	8	256/8	128/8	64/2	1 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	
CEMM 05-4-009	F	2048	64	128	32	1024/16	1024/128	512/8	0.75 <sup>I</sup>	1.5 <sup>I</sup>	1.5 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	
	Y	512	32	128	32	256/16	256/128	128/8	1 <sup>I</sup>	1.5 <sup>I</sup>	1.5 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	
<b><i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i></b>													
CEMM 05-3-090	F	512	32	128	32	1024/16	128/32	128/8	2.5 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	
	Y	64	8	64	16	128/4	16/16	8/4	2.5 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	
CEMM 05-3-048	F	1024	128	64	16	512/256	256/16	256/4	2.5 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	
	Y	32	8	64	16	16/16	4/8	8/2	2.5 <sup>I</sup>	0.25 <sup>S</sup>	0.25 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	
CEMM 05-4-002	F	512	128	64	16	512/128	128/16	128/2	2 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.375 <sup>S</sup>	
	Y	64	16	64	8	32/16	16/16	16/2	1.5 <sup>I</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	0.5 <sup>S</sup>	

AMB: Amphotericin B; CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica; F: Filamentous form; I: Indifference; ITC: Itraconazole; S: Synergism; T-OH: Terpinen-4-ol; TRB: Terbinafine; Y: Yeast form.



**Figure 3. Microscopy of *Sporothrix* sp. biofilms exposed to terpinen-4-ol.** Confocal microscopy images of laser scanning and scanning electron microscopy of *Sporothrix brasiliensis* (CEMM 05-3-050) in filamentous (A, B, E & F) and yeast (C, D, G & H) forms. (A, C, E & G) Mature biofilms without terpinen-4-ol exposure. (B, D, F & H) Biofilms mature after 72 h of exposure to terpinen-4-ol, in their MIC capable of inhibiting 80% of biofilm metabolic activity (SMIC<sub>80</sub>). After exposing the biofilms to terpinen-4-ol SMIC<sub>80</sub>, the reduction of biomass (F & H) and viable cells (B & D) in the biofilms of both fungal forms was observed, with an apparent preservation of the extracellular matrix only in the filamentous form biofilm. Magnification: 5200 × (H), 5000 × (G), 4032 × (E), 2500 × (F) and 400 × (A–D). Scale: 200 μm (A–D), 50 μm (F), 30 μm (E) and 20 μm (G & H). Lasers: 488 nm for detection of SYTO9 (green cells viable) and 561 nm for detection of propidium iodide (red cells dead or membrane damaged).

The antifungal activity of T-OH against planktonic yeast cells of *Sporothrix* spp. was observed, with MIC values ranging from 4 to 32 mg/l. In a previous study [17], we determined the MIC of T-OH for the filamentous form of *Sporothrix* spp., with values of 87.9–1429.8 mg/l. This variation in the susceptibility of the different morphological forms of *Sporothrix* spp. may occur due to differences in the proportions of the cell wall constituents of the fungus, such as glucosamine and β-1,3-glucan [36].

Although the mechanism of action of T-OH on fungal cells has not yet been elucidated, some authors indicate that terpenes such as T-OH may act by interfering with cellular ergosterol biosynthesis [18]. In this study, the changes in the cellular ergosterol content of the yeast form of *Sporothrix* spp. were evaluated after exposure to subinhibitory concentrations of T-OH. The results obtained showed a reduction of up to 73% in the ergosterol content of cells treated with this terpene. This result was similar to that observed for ITC. Ergosterol is the predominant sterol found in fungal cells, where it is responsible for regulating the fluidity and permeability of the membrane. Studies have reported that monoterpenes, such as T-OH, have a lipophilic characteristic, and therefore, have direct or indirect action on the cell membrane structure [20,37,38].

Because biofilm formation is a resilience factor for the survival of microorganisms, we investigated the antifungal activity of T-OH against the biofilms of *Sporothrix* spp., in the filamentous and yeast forms. We observed that the compound reduced biomass and metabolic activity by up to 80% in filamentous biofilms and up to 97% in biofilms of the yeast form of *Sporothrix* spp.

Both for filamentous biofilms and for the yeast form of *Sporothrix* spp., the species *S. brasiliensis* and *S. schenckii* s. str. were more responsive to T-OH compared with *S. globosa* and *S. mexicana*. In addition, we observed better T-OH activity against biofilms of the yeast form of *Sporothrix* spp. compared with filamentous biofilms. For the filamentous form of *Sporothrix* spp., the SMIC<sub>80</sub> values of T-OH were on average 40-times higher than the inhibition values for planktonic cells, whereas for the yeast form this difference was about 20-times larger, demonstrating an increase in tolerance to this drug when the fungus is in the biofilm form.

The high tolerance of biofilms can be related to several characteristics, such as overexpression of efflux pumps, changes in the general physiology of the cell, high cell density and presence of extracellular matrix [39]. The differences observed in the biofilm tolerance of the filamentous and yeast presentations of these fungi may have occurred due to differences in the intensity of biofilm formation, since the filamentous form produces more robust biofilms with greater biomass than the yeast form [4,40].

Although there are few studies evaluating the activity of T-OH against fungal biofilms, Tonon *et al.* [35] reported inhibition of biofilms of *Candida* spp. at concentrations of 2031 mg/l. It has also been demonstrated that T-OH nanoparticles have antifungal potential against the biofilm of *Candida albicans* [41]. In addition, Bucci *et al.* [42] reported that T-OH containing micelles had antiadherent activity, causing disruption of *Candida* spp. previously adhered to the surfaces, thus unstructured the previously formed biofilms.

When combined with conventional antifungal agents, T-OH acted synergistically with ITC and TRB but not with AMB. Considering that the mechanism of action of T-OH is not fully understood, it is difficult to explain the synergism observed with antifungal agents, as it can act on more than one target. Some mechanisms have been proposed for the antimicrobial activity of terpenes. For instance, Oyedemi *et al.* [43], and Zengin and Baysal [44] have shown that a closely chemical-related compound, that is,  $\alpha$ -terpineol, killed several strains of both Gram-positive and -negative bacteria by destabilization of cell membranes. Moreover, interaction with intracellular targets is also suggested [45].

In this study, we demonstrated that T-OH reduces the ergosterol content in *Sporothrix* spp. Considering the action of ITC to inhibit 14- $\alpha$ -demethylase, and TRB to inhibit squalene epoxidase, both involved in ergosterol biosynthesis [46], and the effect of T-OH to reduce the ergosterol content observed in this study, we hypothesize that this compound may also inhibit related enzymes with ergosterol synthesis. Thus, its combination with ITC and TRB could be causing the inhibition of different points in the biosynthesis cascade of ergosterol, which could explain the synergism observed between these drugs [47].

Combinations of T-OH with AMB presented indifferent results. Other studies evaluating the combination of AMB with drugs acting on ergosterol biosynthesis also found indifferent results [48–50]. Although there is no clear explanation for this outcome, some hypotheses may be drawn based on the mechanisms of action of these drugs. Classically, the mechanism of action of AMB is described as the formation of pores in the cell membrane after binding to ergosterol [46,51], which theoretically could generate antagonism when this drug is combined with others that act by reducing the content of cellular ergosterol. However, it has been described that membrane pore formation is not the only way in which AMB exerts its activity, also acting by the induction of oxidative damage in the cell [51]. The presence of this second mechanism of action of AMB, by inducing oxidative stress, which is independent of ergosterol binding, could explain, at least in part, why the combination of AMB and T-OH did not generate antagonistic results, but indifferent.

In previous studies evaluating the absorption and cutaneous distribution of terpenes, it has been reported that T-OH has rapid and progressive cutaneous penetration after topical application [52]. Considering that approximately 95% of cases of sporotrichosis present the localized cutaneous and lymphocutaneous forms of the disease, characterized by the appearance of nodular cutaneous lesions [53], T-OH may become an interesting compound for the study and development of topical formulations for therapeutic use.

## Conclusion

Based on the data presented herein, it is concluded that T-OH has antifungal activity against yeast cells of species of the *S. schenckii* complex, as well as against biofilms of filamentous and yeast forms of these fungi. This effect is due, at least in part, to the reduction in cellular ergosterol content. In addition, this compound has synergistic interaction with ITC and TRB against planktonic cells and sessile *Sporothrix* spp., in both their morphological presentations.

## Future perspective

This study provides insights into further in-depth investigations on the mechanisms of action of T-OH against *S. schenckii* species *in vitro* and the development of *in vivo* studies to verify its efficacy.

## Author contributions

RSN Brillhante contributed to the work conception, drafting and revising, and final approval. VS Pereira contributed to the work conception, data acquisition and analyses, drafting and revising, and final approval. JS de Oliveira contributed to the data acquisition

and analysis, revising and final approval. AM Rodrigues contributed to the work conception, data acquisition and analyses, and final approval. ZP de Camargo contributed to the work conception, data acquisition and analyses, and final approval. WA Pereira-Neto contributed to the work conception, data analyses and final approval. NR Falcão do Nascimento contributed to the work conception, drafting and revising, and final approval. DSCM Castelo-Branco contributed to the work conception, drafting and revising, and final approval. RA Cordeiro contributed to the work conception, drafting and revising, and final approval. JJC Sidrim contributed to the work conception, drafting and revising, and final approval. MFG Rocha contributed to the work conception, drafting and revising, and final approval.

### Acknowledgments

The authors would like to thank the Central Analítica UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pro-Equipmentos CAPES for technical support in obtaining scanning electron microscopic images.

### Financial & competing interests disclosure.

This work was supported by the Coordination of Improvement of Higher-Level Personnel and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil; process number: 305024/2017-5 and 306976/2017-0). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

### Summary points

- Terpinen-4-ol showed antifungal activity against planktonic cells of filamentous and yeast forms of *Sporothrix* spp.
- Terpinen-4-ol caused a significant decrease in the cellular ergosterol content of *Sporothrix* spp.
- Combinations between terpinen-4-ol and the itraconazole and terbinafine showed synergistic interactions against *Sporothrix* spp. in planktonic growth.
- Terpinen-4-ol inhibited *Sporothrix* spp. biofilms in filamentous and yeast forms.
- Combinations between terpinen-4-ol and the itraconazole and terbinafine showed synergistic interactions against *Sporothrix* spp. biofilm.
- Terpinen-4-ol damaged the structure of *Sporothrix* biofilms in both filamentous and yeast forms.
- Terpinen-4-ol causes large reduction in the number viable cells of filamentous and yeast *Sporothrix* biofilm.

### References

Papers of special note have been highlighted as: ● of interest; ●● of considerable interest

1. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med. Mycol.* 53(1), 3–14 (2015).
- **Reports the global distribution of *Sporothrix* spp. species.**
2. Queiroz-Telles F, Fahal AH, Faldi DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect. Dis.* 17(11), e367–e377 (2017).
3. Zhou X, Rodrigues AM, Feng P, De Hoog GS. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Fungal Divers.* 66(1), 153–165 (2014).
4. Brillhante RSN, Aguiar FRM, Silva MLQ *et al.* Antifungal susceptibility of *Sporothrix schenckii* complex biofilms. *Med. Mycol.* 56(3), 297–306 (2018).
- **Reports the capacity of biofilm formation of *Sporothrix schenckii* complex species and its resistance to antifungal drugs.**
5. Brillhante RS, Pereira VS, Oliveira JS *et al.* Pentamidine inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. *Future Microbiol.* 13, 1129–1140 (2018).
- **Reports the capacity of biofilm formation of *S. schenckii* complex species and its resistance to antifungal drugs.**
6. Mahajan VK. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. *Dermatol. Res. Pract.* 1(272376), 1–13 (2014).
7. Baker JH, Goodpasture HC, Kuhns Jr HR, Rinaldi MG. Fungemia caused by an amphotericin B-resistant isolate of *Sporothrix schenckii*. Successful treatment with itraconazole. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 113(11), 1279–1281 (1989).
8. Kim DS, Kim JW, Kim SW. A case of cutaneous disseminated type of sporotrichosis resistant to itraconazole and terbinafine. *Korean J. Med. Mycol.* 2(2), 169–173 (1997).
9. Shinogi T, Misago N, Narisawa Y. Cutaneous sporotrichosis with refractory and reinfectious lesions in a healthy female. *J. Dermatol.* 31(6), 492–496 (2004).


10. Gompertz OF, Rodrigues AM, Fernandes GF, Bentubo HDL, de Camargo ZP, Petri V. Atypical clinical presentation of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* resistant to itraconazole. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94(6), 1218–1222 (2016).
11. Waller SB, Madrid IM, Faria RO de, Cleff MB, Mello JRB de, Meireles MCA. Anti-*Sporothrix* spp. activity of medicinal plants. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 52(2), 221–237 (2016).
12. Martins N, Barros L, Henriques M, Silva S, Ferreira ICFR. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Ind. Crops Prod.* 74, 648–670 (2015).
13. Scorzoni L, Sangalli-Leite F, de Lacorte Singulani J, Costa-Orlandi CB, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. Searching new antifungals: the use of *in vitro* and *in vivo* methods for evaluation of natural compounds. *J. Microbiol. Methods* 123, 68–78 (2016).
14. Waller SB, Peter CM, Hoffmann JF *et al.* Chemical composition and *in vitro* activity of Green and Jatá Brazilian propolis on clinical isolates of *Sporothrix brasiliensis*. *Sci. Anim. Heal.* 5(2), 151–165 (2017).
15. Couto CSF, Raposo NRB, Rozental S *et al.* Chemical composition and antifungal properties of essential oil of *Origanum vulgare* Linnaeus (Lamiaceae) against *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *Trop. J. Pharm. Res.* 14(7), 1207–1212 (2015).
16. da SM Forezi L, Borba-Santos LP, Cardoso MFC, Ferreira VF, Rozental S, de C da Silva F. Synthesis and antifungal activity of coumarins derivatives against *Sporothrix* spp. *Curr. Top. Med. Chem.* 18(2), 164–171 (2018).
17. Brillhante RSN, Silva NF, Marques FJ de F *et al.* *In vitro* inhibitory activity of terpenic derivatives against clinical and environmental strains of the *Sporothrix schenckii* complex. *Med. Mycol.* 53(2), 93–98 (2015).
- **Reports the antifungal activity of terpinen-4-ol against filamentous form of *S. schenckii* complex species.**
18. Brillhante RSN, Caetano ÉP, de Lima RAC *et al.* Terpinen-4-ol, tyrosol, and  $\beta$ -lapachone as potential antifungals against dimorphic fungi. *Brazilian J. Microbiol.* 47(4), 917–924 (2016).
19. Morcia C, Malnati M, Terzi V. *In vitro* antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1, 8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Addit. Contam. Part A* 29(3), 415–422 (2012).
20. Hammer KA, Carson CF, Riley T V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 53(6), 1081–1085 (2004).
21. Rodrigues AM, de Melo Teixeira M, de Hoog GS *et al.* Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7(6), e2281 (2013).
22. Rodrigues AM, de Hoog S, de Camargo ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Med. Mycol.* 51(4), 405–412 (2013).
23. Borba-Santos LP, Reis de Sá LF, Ramos JA *et al.* Tacrolimus increases the effectiveness of itraconazole and fluconazole against *Sporothrix* spp. *Front. Microbiol.* 8, 1759 (2017).
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. *M38A2: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard (2nd Edition)*. Wayne, PA, USA (2008).
25. Clinical and Laboratory Standards Institute. *M27A3: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard (3rd Edition)*. Wayne, PA, USA (2008).
26. Scordino F, Pernice I, Passo C Lo *et al.* Antifungal susceptibilities of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Italy. *J. Biol. Res.* 88(1), 139–140 (2015).
27. Moran GP, Pinjon E, Coleman DC, Sullivan DJ. Analysis of drug resistance in pathogenic fungi. In: *Medical Mycology: Cellular and Molecular Techniques* Kavanagh K (Ed.). John Wiley & Sons, Chichester, UK, 93–113 (2007).
28. Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR *et al.* A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat. Protoc.* 3(9), 1494 (2008).
29. Espinel-Ingroff A, Abreu DPB, Almeida-Paes R *et al.* Multicenter and international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values (ECVs) for species of *Sporothrix* identified by molecular methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61(10), e01057–e01117 (2017).
- **Proposes the definition of epidemiological cutoff point for the susceptibility of *S. schenckii* complex species.**
30. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.* 52(1), 1 (2003).
31. Valentín A, Cantón E, Pemán J, Fernandez-Rivero ME, Tormo-Mas MA, Martínez JP. *In vitro* activity of anidulafungin in combination with amphotericin B or voriconazole against biofilms of five *Candida* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 71(17), 3449–3452 (2016).
32. Gao L, Sun Y, He C, Zeng T, Li M. Synergistic effects of tacrolimus and azoles against *Exophiala dermatitidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61(12), e00948–e01017 (2017).
33. Martínez A, Rojas N, García L, González F, Domínguez M, Catalán A. *In vitro* activity of terpenes against *Candida albicans* and ultrastructural alterations. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.* 118(5), 553–559 (2014).
34. Ninomiya K, Maruyama N, Inoue S *et al.* The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) and its main component, terpinen-4-ol protect mice from experimental oral candidiasis. *Biol. Pharm. Bull.* 35(6), 861–865 (2012).
- **Reports the antifungal activity, *in vivo*, of terpinen-4-ol.**

35. Tonon CC, Francisconi RS, Bordini EAF, Huacho PMM, Sardi J de CO, Spolidorio DMP. Interactions between Terpinen-4-ol and Nystatin on biofilm of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Braz. Dent. J.* 29(4), 359–367 (2018).
36. Martínez-Álvarez JA, Pérez-García LA, Mellado-Mojica E *et al.* *Sporothrix schenckii sensu stricto* and *Sporothrix brasiliensis* are differentially recognized by human peripheral blood mononuclear cells. *Front. Microbiol.* 8, 843 (2017).
37. Parveen M, Hasan MK, Takahashi J *et al.* Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 54(1), 46–55 (2004).
38. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindós G. *In vitro* activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Complement. Altern. Med.* 11(1), 119 (2011).
39. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int. J. Microbiol.* 2012, 528521 (2012).
40. Brillhante RSN, Silva MLQ da, Pereira VS *et al.* Potassium iodide and miltefosine inhibit biofilms of *Sporothrix schenckii* species complex in yeast and filamentous forms. *Med. Mycol.* doi:10.1093/mmy/myy119 (2018) (Epub ahead of print).
41. Sun L, Zhang C, Li P. Characterization, antibiofilm, and mechanism of action of novel PEG-stabilized lipid nanoparticles loaded with terpinen-4-ol. *J. Agric. Food Chem.* 60(24), 6150–6156 (2012).
42. Bucci AR, Marcelino L, Mendes RK, Etchegaray A. The antimicrobial and antiadhesion activities of micellar solutions of surfactin, CTAB and CPCL with terpinen-4-ol: applications to control oral pathogens. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34(6), 86 (2018).
43. Oyedemi SO, Okoh AI, Mabinya L V, Pirochenva G, Afolayan AJ. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol,  $\alpha$ -terpineol and g-terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African J. Biotechnol.* 8(7), 1280–1286 (2009).
44. Zengin H, Baysal A. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure–activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules* 19(11), 17773–17798 (2014).
45. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 3, 12 (2012).
46. Prasad R, Shah AH, Rawal MK. Antifungals: mechanism of action and drug resistance. In: *Yeast Membrane Transport*. Springer, Cham, Switzerland, 327–349 (2016).
47. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(3), 693–715 (2004).
48. Santos JRA, Gouveia LF, Taylor ELS *et al.* Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(5), 2553–2558 (2012).
49. Kalkanci A, Dizbay M, Sari N *et al.* Fluconazole, caspofungin, voriconazole in combination with amphotericin B. *Open Med.* 5(2), 194–197 (2010).
50. Li H, Lu Q, Wan Z, Zhang J. *In vitro* combined activity of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35(6), 550–552 (2010).
51. Mesa-Arango AC, Scorzoni L, Zaragoza O. It only takes one to do many jobs: amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front. Microbiol.* 3, 286 (2012).
52. Cal K, Kupiec K, Sznitowska M. Effect of physicochemical properties of cyclic terpenes on their *ex vivo* skin absorption and elimination kinetics. *J. Dermatol. Sci.* 41(2), 137–142 (2006).
- **Reports the physicochemical properties of terpinen-4-ol on their *ex vivo* skin.**
53. Orofino-Costa R, Macedo PM de, Rodrigues AM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An. Bras. Dermatol.* 92(5), 606–620 (2017).





## Exogenous fungal quorum sensing molecules inhibit planktonic cell growth and modulate filamentation and biofilm formation in the *Sporothrix schenckii* complex

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante<sup>a</sup>, Vandbergue Santos Pereira<sup>a</sup>, Augusto Feynman Dias Nobre<sup>a</sup>, Jonathas Sales de Oliveira<sup>a</sup>, Mirele Rodrigues Fernandes<sup>a</sup>, Anderson da Cunha Costa<sup>a</sup>, Anderson Messias Rodrigues<sup>b</sup> , Zoilo Pires de Camargo<sup>b</sup>, Waldemiro Aquino Pereira-Neto<sup>a</sup>, José Júlio Costa Sidrim<sup>a</sup> and Marcos Fábio Gadelha Rocha<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará. Rua Cel. Nunes de Melo, Fortaleza, Brazil; <sup>b</sup>Cellular Biology Division, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo. Rua Botucatu, São Paulo, Brazil; <sup>c</sup>Postgraduate Program in Veterinary Sciences, College of Veterinary, State University of Ceará, Fortaleza, Brazil

### ABSTRACT

This study investigated the effect of the quorum sensing molecules (QSMs) farnesol, 2-phenylethanol, tyrosol and tryptophol against planktonic cells, filamentation and biofilms of *Sporothrix* spp. The antifungal activity of QSMs was evaluated by broth microdilution. QSMs showed MICs in the ranges of 0.01–1 µM (farnesol), 1–8 mM (2-phenylethanol and tyrosol), and >16 mM (tryptophol). Filamentous biofilm formation was inhibited by farnesol and 2-phenylethanol and stimulated by tyrosol. Yeast biofilm formation was inhibited by 2-phenylethanol and tyrosol. Tryptophol did not affect *Sporothrix* biofilm formation. QSMs showed MICs against mature biofilms of 8–32 µM (farnesol), 8–32 mM (2-phenylethanol) and 64–128 mM (tyrosol). In conclusion, farnesol, 2-phenylethanol and tyrosol have antifungal activity against planktonic and sessile cells and modulate filamentation and biofilm formation in *Sporothrix* spp.

### ARTICLE HISTORY

Received 16 May 2020  
Accepted 17 September 2020

### KEYWORDS

Antifungal activity; biofilm; farnesol; 2-phenylethanol; *Sporothrix*; tyrosol; tryptophol

### Introduction

Sporotrichosis is a subcutaneous infection caused by dimorphic fungi belonging to the genus *Sporothrix* (Ramírez-Soto et al. 2018). It is the most common subcutaneous fungal infection worldwide, with high prevalence in countries, such as Brazil, India, Australia, South Africa, China and Japan (Lopes-Bezerra et al. 2018). Like other microorganisms, *Sporothrix* spp. have some adaptations to establish themselves in hostile environments, such as biofilm formation (Brilhante et al. 2018b; Singh et al. 2020). One of the important factors for the formation of biofilms is cellular communication mediated by the quorum sensing system. This system is involved in the secretion of self-inducing signaling molecules that accumulate and modulate microbial behavior on a population scale (Zhang et al. 2019).

In fungi, quorum sensing molecules (QSMs) regulate important functions such as pathogenesis, morphogenesis and filamentation (Padder et al. 2018). In infectious processes, QSMs are implicated in the

dissemination and establishment of colonies at distal locations and can induce oxidative stress in macrophages (Wongsuk et al. 2016). Considering that the formation and maturation of biofilms are also influenced by these molecules, the modulation of this system through the inactivation or addition of QSMs can interfere with the dynamics of biofilms, reducing their formation or eliminating them (Paluch et al. 2020).

Some fungal QSMs have already been described, such as farnesol, tyrosol, 2-phenylethanol and tryptophol (Mehmood et al. 2019). Farnesol was the first extracellular molecule reported as a QSM in a fungal species (Hornby et al. 2001). This QSM acts by blocking yeast-to-filamentous transition at high cell density in *Candida albicans* (Lindsay et al. 2012). Previous studies have shown that farnesol have antifungal activity against *C. albicans* (Cordeiro et al. 2013), *Cryptococcus* spp. (Cordeiro et al. 2012), *Histoplasma capsulatum* (Brilhante et al. 2015a), *Coccidioides posadasii* (Brilhante et al. 2013) and filamentous form of

*Sporothrix* spp. (Brilhante et al. 2015b) Also, farnesol inhibits biofilm formation of *Candida* spp. (Hall et al. 2011) and *Trichosporon* spp. (Cordeiro et al. 2019).

Tyrosol is another QSM that plays a role in stimulating germ tube, pseudohypha and biofilm formation in *C. albicans* (Sebaa et al. 2019) as well as showing antifungal activity against *Candida* spp. (Cordeiro et al. 2015), *H. capsulatum* and *C. posadasii* (Brilhante et al. 2016a). 2-Phenylethanol inhibits biofilm formation by *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium* spp. (Liu et al. 2014; Wongsuk and Luplertlop 2020). Tryptophol regulates the germination of *Aspergillus* sp. and adhesion of *Debaryomyces hansenii*, and reduced the filament and virulence of *Candida* spp. in an *in vivo* model (Mehmood et al. 2019; Singkum et al. 2019). However, the effect of these QSMs on biofilm formation by *Sporothrix* spp. is not clearly understood.

Thus, this study aimed to determine the minimal inhibitory concentrations of the quorum sensing molecules farnesol, tyrosol, 2-phenylethanol and tryptophol against planktonic cells of species of the *Sporothrix schenckii* complex as well as to evaluate the effects of these compounds on filamentation, biofilm formation and mature biofilms of *Sporothrix* spp.

## Material and methods

### Microorganisms

Fifteen strains belonging to the *S. schenckii* complex were used: six *S. brasiliensis*, three *S. globosa*, three *S. mexicana* and three *S. schenckii sensu stricto*. The isolates were obtained from the culture collection of the Specialized Medical Mycology Center (CEMM) of Ceará Federal University. These strains were previously characterized at the species level by sequencing the calmodulin locus region (Rodrigues et al. 2013a, 2013b). For experimentation with *Sporothrix* spp. in the filamentous form, cultures were grown on potato dextrose agar (PDA, Himedia, Mumbai, India) and incubated at 28 °C for 7 days. To obtain the yeast form, cultures were grown in brain heart infusion agar (BHI, Himedia, Mumbai, India) and incubated at 37 °C for 7 days. In addition, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *Candida krusei* ATCC 6258 were used as quality controls in the antifungal susceptibility tests (CLSI 2017a).

### Chemicals

Farnesol, 2-phenylethanol, tyrosol and tryptophol were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

and diluted in methanol (farnesol and 2-phenylethanol) or water (tyrosol and tryptophol) at a concentration of 2 M (farnesol and 2-phenylethanol) or 1 M (tyrosol and tryptophol) immediately before use (Cordeiro et al. 2015; Wongsuk and Luplertlop 2020). The antifungal drugs amphotericin B (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), itraconazole (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium) and terbinafine (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) were solubilized in DMSO as recommended in document M38-ed3 (CLSI 2017a) and stored at −20 °C until use.

### Antifungal susceptibility test with planktonic cells of *Sporothrix* spp.

Susceptibility tests with all strains of *Sporothrix* spp. were performed using the broth microdilution technique according to the documents M38-ed3 (filamentous form) and M27-ed4 (yeast form) of the CLSI, with modifications (CLSI 2017a, 2017b). Drugs were tested at final concentrations ranging from 0.007 to 4 μM for farnesol (Brilhante et al. 2015a), 0.03 to 16 mM for 2-phenylethanol, tyrosol and tryptophol (Wongsuk and Luplertlop 2020), and from 0.03 to 16 μg ml<sup>−1</sup> for amphotericin B, itraconazole and terbinafine (CLSI 2017a). Inocula were prepared in saline solution and adjusted to final concentration of 0.4–0.5 × 10<sup>5</sup> cfu ml<sup>−1</sup> (filamentous form) or 0.5–2.5 × 10<sup>3</sup> cfu ml<sup>−1</sup> (yeast form) in RPMI 1640 medium (Sigma, St Louis, USA), buffered to pH 7.0 with 0.165 M MOPS (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Plates were incubated at 35 °C for 72 h (filamentous form) or 37 °C for 96 h (yeast form). The MIC (minimum inhibitory concentration) of QSMs and antifungal drugs were defined as the lowest concentration capable of inhibiting 100% (amphotericin B and itraconazole) or 80% (terbinafine, farnesol, 2-phenylethanol, tyrosol and tryptophol) of fungal growth, when compared with drug-free growth control (Brilhante et al. 2015a; CLSI 2017a). *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 were used as quality controls in each assay (CLSI 2017a). Tests were performed in duplicate at two different moments.

### Effect of QSMs on the filamentation of *Sporothrix*

The filamentation assay was performed using the method described by Bernardo et al. (2014), with adaptations. A representative strain (*S. brasiliensis* CEMM 05-3-05) was used in the tests. Briefly, a cell density of 10<sup>6</sup> conidia ml<sup>−1</sup> was prepared in RPMI 1640 medium and exposed to a concentration of 0.031 μM farnesol, 0.5 mM 2-phenylethanol and 1 mM

tyrosol. Cells were then incubated at 30 °C for up to 72 h. Hyphal development was monitored at specific times (0, 24, 48 and 72 h) using bright-field techniques with an Olympus BX41 light microscope. Images were captured with an Olympus DP71 digital camera.

### Effect of QSMs on the formation of *Sporothrix* biofilms

The effect of the QSMs on all strains of *Sporothrix* spp. was evaluated in the biofilm formation stage as described by Brillhante et al. (2018b). An aliquot of fungal suspension at  $1 \times 10^6$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  (filamentous form) or  $2 \times 10^5$  cells  $\text{ml}^{-1}$  (yeast form), prepared in sterile PBS, was added to each well of a 96-well polystyrene microplates and incubated at 35 °C (filamentous form) or 37 °C (yeast form) for 24 h for cell adhesion. After 24 h, the wells were washed twice with sterile PBS to remove non-adherent cells and RPMI 1640 medium was added with different sub-inhibitory concentrations of QSMs. In the experiments with filamentous biofilms, farnesol (0.004-0.063  $\mu\text{M}$ ), 2-phenylethanol (0.06-1 mM), tyrosol (0.125-2 mM) and tryptophol (1-16 mM) were used, with plate incubation for a period of 120 h at 35 °C. In the experiments with yeast biofilms, farnesol (0.002-0.031  $\mu\text{M}$ ), 2-phenylethanol (0.03-0.5 mM), tyrosol (0.03-0.5 mM) and tryptophol (1-16 mM) were used, with plate incubation for a period of 96 h at 37 °C. Negative controls (only RPMI medium) and positive controls (RPMI without drug) were used in each test. The effect of contact with the molecules was evaluated by quantifying the biomass by violet crystal staining and measuring the metabolic activity by the XTT reduction assay. In addition, analysis of the structure and morphology of the biofilms was performed using confocal laser scanning microscopy (CLSM) and scanning electron microscopy (SEM).

### Quantification of biomass

The quantification of the biomass was performed by the violet crystal staining technique. Wells containing biofilm were washed twice with PBS and then dehydrated with methanol for approximately 5 min. Subsequently, 200  $\mu\text{l}$  of 0.3% violet crystal were added to each well. After 20 min, the dye was removed and the wells were washed with distilled water. After washing, the dye impregnated in the cell material was removed by adding 200  $\mu\text{l}$  of 33% (v/v) acetic acid for 30 s. The supernatants were transferred to new microtiter plates and read with a spectrophotometer (Celer

Biotecnologia S/A, Minas Gerais, Brazil) at 540 nm (Brilhante et al. 2015b).

### Quantification of metabolic activity

Quantification of metabolic activity by the XTT reduction assay followed the protocol described by Brillhante et al. (2016b), with adaptations. The microplate wells were washed with PBS and then filled with 125  $\mu\text{l}$  of XTT solution (0.5  $\text{mg ml}^{-1}$ ) with 10  $\mu\text{l}$  of menadione solution (1 mM). The plates were incubated for 3 h in the dark, at 35 °C. After this period, the solutions were transferred to new microtiter plates and read with a spectrophotometer at 492 nm.

### Structure and morphology of biofilms formed with QSMs

The QSMs that caused significant change in biomass and metabolic activity of *Sporothrix* biofilms were evaluated for their effects on the biofilm structure and morphology. A representative strain of *S. brasiliensis* was used. Biofilms were formed on Thermanox™ slides (Thermo Fisher Scientific, New York, USA) in the presence and absence of QSMs, as described above, and evaluated by CLSM and SEM.

For analysis by CLSM, biofilms formed on Thermanox™ slides were washed with PBS and stained using the Live/Dead™ staining kit (Invitrogen, CA, USA). Biofilms were analyzed with a Nikon C2 microscope (Tokyo, Japan) at 488 nm for detection of SYTO 9 fluorescent dye, which identifies live cells, and at 561 nm for detection of propidium iodide, which identifies dead or damaged cells (Brilhante et al. 2018a). For the analysis of three-dimensional images, five equidistant points were evaluated in each image to obtain representative results for the samples. Confocal image analyses were performed using the COMSTAT2 tool associated with the ImageJ 1.50v software to quantify substratum coverage, roughness coefficient and average thickness (Heydorn et al. 2000).

For analysis by SEM, the biofilms were washed twice with cacodylate buffer (0.15 M, pH 7.2). Biofilms were then covered with glutaraldehyde [2.5% in 0.15 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) with 0.1% alcian blue] and incubated at 25 °C for 4 h. Subsequently, biofilms were washed twice with cacodylate buffer and the coverslips were dehydrated in an ascending ethanol concentration (30, 50, 70, 80, 95 and 100%) for 10 min each, repeating dehydration with the last concentration (100% ethanol). Then the

**Table 1.** The MICs of antifungal drugs and quorum sensing molecules against *Sporothrix* species in filamentous and yeast forms.

Species (n)	Antifungal drugs ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )			Quorum sensing molecules			
	AMB	ITC	TRB	F-OH ( $\mu\text{M}$ )	P-OH (mM)	TYR (mM)	TRP (mM)
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (6)							
F	0.5-4	0.25-2	0.06-0.125	0.06-0.125	1-8	1-8	>16
Y	0.06-0.5	0.25-1	0.031-0.125	0.03-0.06	0.5-2	0.5-4	>16
<i>S. globosa</i> (3)							
F	0.5-2	0.5-2	0.06-0.125	0.03-0.25	0.5-8	2-4	>16
Y	0.03-0.25	0.03-0.25	0.03-0.125	0.03-0.06	0.5-2	1-2	>16
<i>S. mexicana</i> (3)							
F	1-4	0.5-2	0.125-0.25	0.01-1	1-4	1-4	>16
Y	0.25-0.5	0.25-1	0.03-0.125	0.03-0.125	1-2	1-2	>16
<i>S.schenckii</i> s. str. (3)							
sF	0.25-1	0.5-1	0.125-0.25	0.125-1	2-4	2-8	>16
Y	0.06-0.125	0.25-0.5	0.03-0.125	0.06-0.125	1-2	1-4	>16

AMB: amphotericin B. ITC: itraconazole. TRB: terbinafine. F-OH: farnesol. TYR: tyrosol. P-OH: 2-phenylethanol. TRP: tryptophol. F: filamentous form. Y: yeast form. Values expressed as a range.

biofilms were dried at room temperature and covered with hexamethyldisilazane (HMDS) (Polysciences Europe, Germany) for 15 min. Afterwards, the HMDS was removed and the biofilms were dried overnight in a desiccator. Slides were covered with 12 nm of gold (Emitech Q150T) and observed with a Quanta 450-FEG scanning electron microscope in high vacuum mode at 20 kV (Brilhante et al. 2018a).

#### Effect of QSMs on *Sporothrix* mature biofilms

To determine the effect of QSMs on mature *Sporothrix* biofilms, these were formed in 96-well polystyrene plates as described above. Once formed, the biofilms were washed with PBS, and 200  $\mu\text{l}$  aliquots of RPMI 1640 medium containing serial dilutions of each QSM were added to the microplates, which were then incubated at 35 °C (filamentous form) or 37 °C (yeast form) for 72 h. QSMs concentrations were 0.125-64  $\mu\text{M}$  for farnesol, 0.125-64 mM for 2-phenylethanol, and 0.25-128 mM for tyrosol and tryptophol. After exposure, biofilm susceptibility to drugs was assessed by quantification of metabolic activity by the XTT reduction assay (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), as previously described. The sessile minimum inhibitory concentration (SMIC) was determined as the lowest concentration capable of causing 50% (SMIC<sub>50</sub>) inhibition of biofilm metabolic activity compared to the metabolic activity of drug-free control (Xia et al. 2017).

#### Statistical analysis

All assays were performed in triplicate at two different moments. For data with normal distribution and similar variances, the Student's t-test or ANOVA were used, followed by Tukey's *post hoc* test. For data with asymmetrical distribution, Wilcoxon's or

Friedman's nonparametric test was used, followed by Dunn's *post hoc* test. The maximum significance value adopted for affirmative conclusions was 5%. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## Results

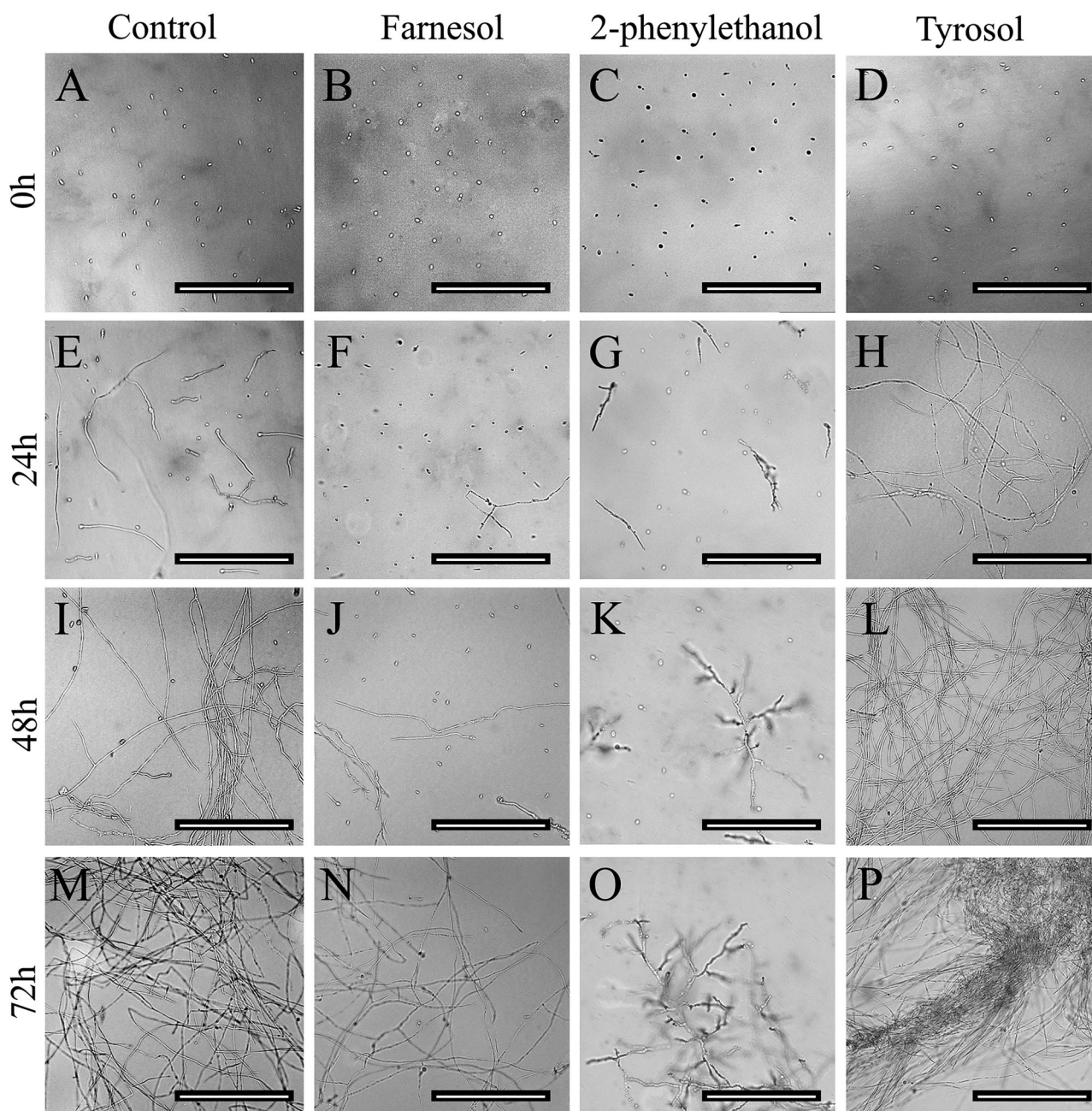
### Antifungal susceptibility of planktonic cells

The quorum sensing molecules showed MIC values ranging from 0.01 to 1  $\mu\text{M}$  for farnesol; from 1 to 8 mM for 2-phenylethanol and tyrosol - for the filamentous form of *Sporothrix* spp. (Table 1). Lower values were observed against the yeast form of *Sporothrix* spp. (Table 1), with MICs ranging from 0.03 to 0.125  $\mu\text{M}$  for farnesol, 0.5 to 2 mM for 2-phenylethanol; and 0.5 to 4 mM for tyrosol. Tryptophol showed an MIC higher than 16 mM against both forms of *Sporothrix*. No significant difference in MIC values was observed among *Sporothrix* species.

For antifungal drugs, MIC values against the filamentous form of *Sporothrix* spp., ranged from 0.25 to 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for amphotericin B, from 0.25 to 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for itraconazole, and from 0.03 to 0.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for terbinafine. For the yeast form varied from 0.03 to 0.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for amphotericin B, 0.03 to 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for itraconazole, and 0.03 to 0.13  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for terbinafine.

### Effects of QSMs on the filamentation of *Sporothrix*

The effects of QSMs on the filamentation of *Sporothrix* can be seen in Figure 1. Farnesol and 2-phenylethanol were able to reduce/retard the filamentation of *Sporothrix* in comparison with the filamentation observed in the drug-free control. In contrast, tyrosol stimulated the filamentation of *Sporothrix* compared with the drug-free control.

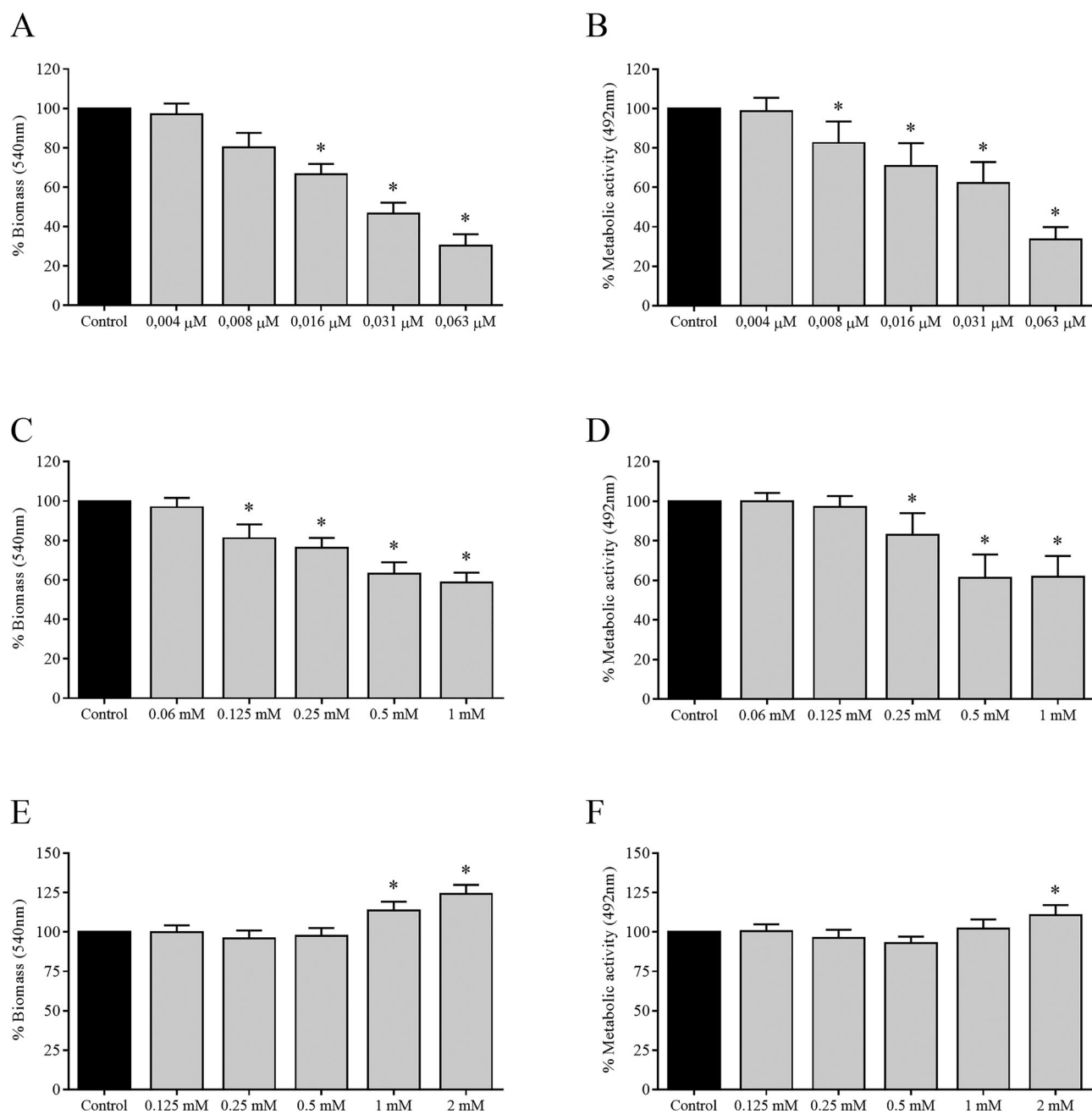


**Figure 1.** Effect of quorum sensing molecules on the filamentation of *S. brasiliensis* (CEMM 05-3-050). Cells were cultivated on RPMI 1640 medium (A, E, I and M), RPMI 1640 supplemented with 0.031  $\mu\text{M}$  farnesol (B, F, J and N), 0.5 mM 2-phenylethanol (C, G, K and O) and 1 mM tyrosol (D, H, L and P), with incubation for 0 h (A – D), 24 h (E – H), 48 h (I – L) and 72 h (M – P). Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ . Images were taken with an optical microscope using a  $\times 40$  objective.

### Effects of QSMs on biofilm formation

The effects of QSMs on biofilm formation by *Sporothrix* spp. in the filamentous form can be seen in Figure 2. The addition of farnesol during biofilm formation of *Sporothrix* spp. in the filamentous form reduced the production of biomass and metabolic activity, starting at a concentration of 0.008  $\mu\text{M}$ , and reaching maximum reductions of 70% in biomass and 66% in metabolic activity when exposed to 0.063  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ). The addition of 2-phenylethanol reduced

biomass production and the metabolic activity, starting at a concentration of 0.125 mM, with maximum reductions of 49% in biomass and 38% in metabolic activity at 1 mM ( $p < 0.05$ ). Tyrosol had the opposite effect, increasing biomass production by 24% and metabolic activity by 10% in the biofilms of the filamentous form of *Sporothrix* spp. treated with 2 mM ( $p < 0.05$ ). Tryptophol did not alter biomass production and biofilm metabolic activity of *Sporothrix* spp. in the filamentous form (data not shown).

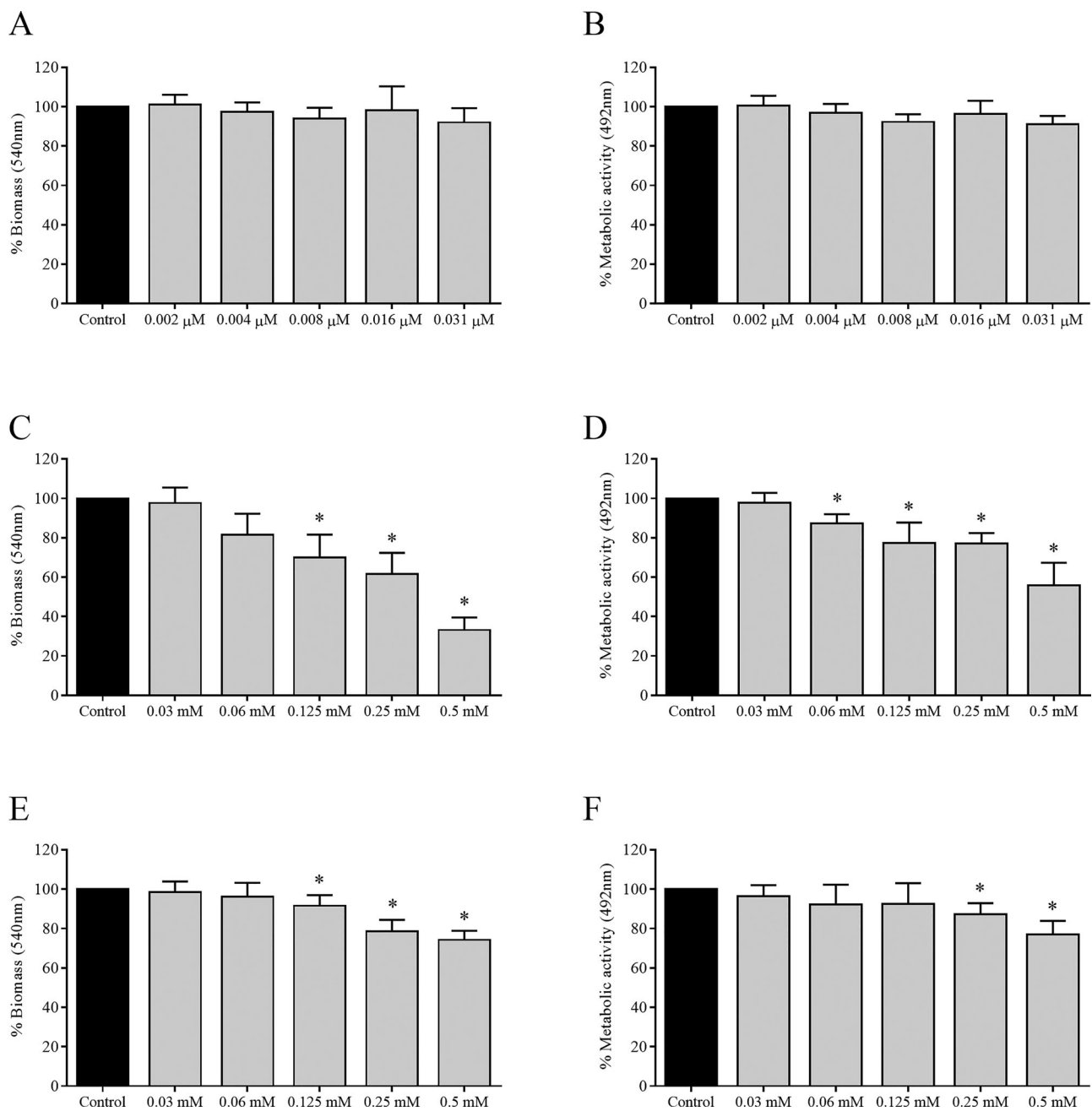


**Figure 2.** Effect of quorum sensing molecules on biofilm formation of *Sporothrix* spp. in filamentous form. Quantification of biomass (A, C and E) and metabolic activity (B, D and F) of biofilms formed in the presence of farnesol (A and B), 2-phenylethanol (C and D) and tyrosol (E and F). Black bars correspond to biofilms formed in RPMI 1640 medium without drugs (control). Gray bars represent biofilms treated with different concentrations of the compounds. Asterisks indicate significant differences compared with the unexposed control ( $p < 0.05$ ). Results expressed as means  $\pm$  SDs.

The effects of QSMs in biofilm formation of *Sporothrix* spp. in the yeast form can be seen in Figure 3. Farnesol did not alter the biofilm formation capacity of *Sporothrix* spp. in the yeast form. Similar to the results obtained for the formation of filamentous biofilms, 2-phenylethanol reduced the biomass and metabolic activity of yeast biofilms by 19% and 13%, respectively, at 0.06 mM ( $p < 0.05$ ), and caused reductions of 47% and 45% in biomass and metabolic

activity, respectively, at 0.5 mM ( $p < 0.05$ ). Regarding the formation of yeast biofilms, no stimulus was observed. Instead, reductions of 36% in biomass and 33% in metabolic activity using 0.5 mM tyrosol ( $p < 0.05$ ) were observed. Tryptophol did not alter biomass production and biofilm metabolic activity of *Sporothrix* spp. in the yeast form (data not shown).

Microscopic images (Figure 4) showed that filamentous biofilms formed in the presence of farnesol

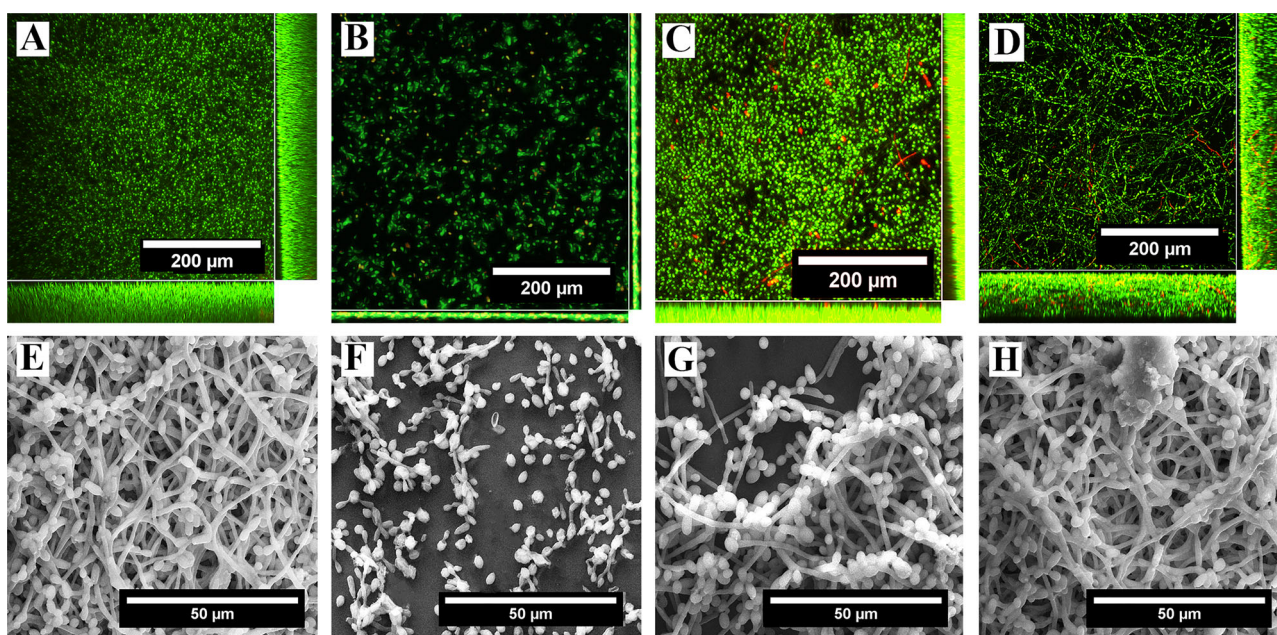


**Figure 3.** Effect of quorum sensing molecules on biofilm formation by *Sporothrix* spp. in yeast form. Quantification of biomass (A, C and E) and metabolic activity (B, D and F) of biofilms formed in the presence of farnesol (A and B), 2-phenylethanol (C and D) and tyrosol (E and F). Black bars correspond to biofilms formed in RPMI 1640 medium without drugs (control). Gray bars represent biofilms treated with different concentrations of the compounds. Asterisks indicate significant differences compared to the unexposed control ( $p < 0.05$ ). Results expressed as means  $\pm$  SDs.

presented a considerable reduction in the cell density and in the filament number (Figure 4b and f). Farnesol also caused a reduction of 64% in the substratum coverage, 29% in the roughness coefficient and 72% in the average biofilm thickness (Table 2). 2-Phenylethanol also caused a reduction in the biofilm population density in the biofilms, without a reduction in filaments (Figure 4g), and caused a reduction of 47% in the substratum coverage, 14% in the

roughness coefficient and 53% in the average biofilm thickness (Table 2). A different effect was observed in biofilms formed in the presence of tyrosol, where a 24% increase in thickness was observed, along with more filaments than in the control (Table 2).

The micrographs obtained from the *Sporothrix* biofilms in the yeast form (Figure 5) demonstrated that 2-phenylethanol caused a reduction in population density (Figure 5b and e) and decreases of 16% in



**Figure 4.** Micrographs of biofilms of *S. brasiliensis* (CEMM 05-3-050) in filamentous form formed in the presence of quorum sensing molecules (120 h). LSCM (A - D) and SEM (E - H). A and E: biofilms formed without exposure to drugs. B and F: biofilms formed in the presence of 0.063  $\mu\text{M}$  farnesol. C and G: biofilms formed in the presence of 1 mM 2-phenylethanol. D and H: biofilms formed in the presence of 2 mM tyrosol. Magnification:  $\times 3,000$  (E - H),  $\times 400$  (A - D). Scale bars: 200  $\mu\text{m}$  (A - D) and 50  $\mu\text{m}$  (E - H). Lasers: 488 nm for detection of SYTO9 and 561 nm for detection of propidium iodide.

**Table 2.** Analysis of LSCM images of biofilms of *Sporothrix* spp. treated with exogenous quorum sensing molecules.

Parameter	Control	Quorum sensing molecules		
		Farnesol	2-Phenylethanol	Tyrosol
<b>Filamentous form</b>				
Substratum coverage ( $\mu\text{m}^2$ )	1.58 $\pm$ 21	575 $\pm$ 14	836 $\pm$ 33	1.62 $\pm$ 43
Roughness coefficient	5.20 $\pm$ 0.30	3.70 $\pm$ 1.3	4.50 $\pm$ 2.1	5.60 $\pm$ 1.1
Average thickness ( $\mu\text{m}$ )	64.8 $\pm$ 1.80	18.1 $\pm$ 1.4	30.4 $\pm$ 3.2	80.3 $\pm$ 2.4
<b>Yeast form</b>				
Substratum coverage ( $\mu\text{m}^2$ )	1.04 $\pm$ 11	1.10 $\pm$ 21	875 $\pm$ 31	768 $\pm$ 35
Roughness coefficient	2.10 $\pm$ 0.30	2.00 $\pm$ 0.60	1.40 $\pm$ 0.60	1.80 $\pm$ 0.50
Average thickness ( $\mu\text{m}$ )	33.6 $\pm$ 1.4	31.4 $\pm$ 0.30	13.1 $\pm$ 0.40	13.7 $\pm$ 0.70

The results are expressed as geometric means  $\pm$  SDs.

substratum coverage, 33% in roughness coefficient and 61% in average biofilm thickness (Table 2). A similar effect was observed for tyrosol (Figure 5c and f), with reductions of 26% in the substratum coverage, 14% in roughness coefficient and 59% in average biofilm thickness (Table 2).

#### Inhibitory effects of QSMs on mature biofilms

The exposure of mature biofilms of *Sporothrix* spp. to farnesol, 2-phenylethanol and tyrosol caused significant reductions in the metabolic activity (Table 3). For filamentous biofilms, the SMIC<sub>50</sub> values ranged from 8 to 32  $\mu\text{M}$  for farnesol, from 8 to 32 mM for 2-phenylethanol, and from 64 to 128 mM for tyrosol. For yeast biofilms, SMIC<sub>50</sub> values ranged from 1 to 16  $\mu\text{M}$  for farnesol, 4 to 16 mM for 2-phenylethanol, and 32 to 128 mM for tyrosol. Tryptophol did not

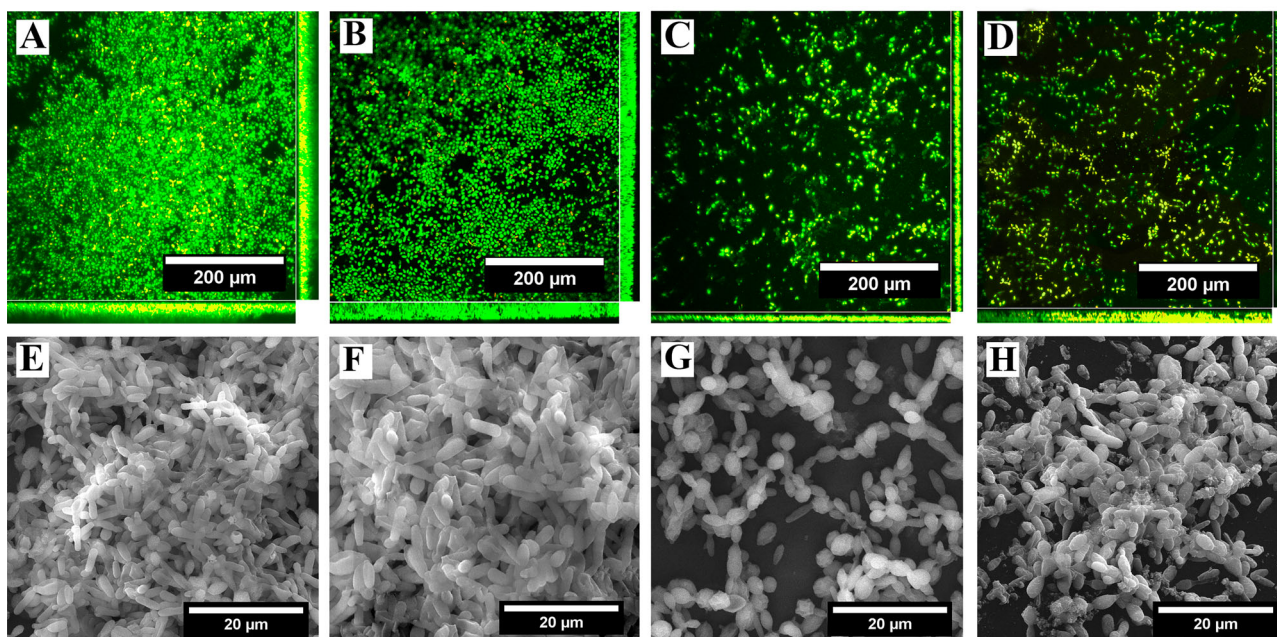
have inhibitory activity (SMIC<sub>50</sub> > 128 mM) against *Sporothrix* biofilms in both filamentous and yeast forms.

#### Discussion

Recent studies have demonstrated the ability of *Sporothrix* spp. to form biofilms in both filamentous and yeast forms (Brilhante et al. 2018a, 2018b). However, the mechanisms involved in biofilm formation by these pathogenic species are poorly understood. The present study evaluated the effects of four QSMs (farnesol, tyrosol, 2-phenylethanol and tryptophol) on the growth of planktonic cells as well as on biofilm formation and against mature biofilms of *Sporothrix* spp.

In the susceptibility tests with planktonic cells, farnesol presented antifungal activity against *Sporothrix*





**Figure 5.** Micrographs of biofilms of *S. brasiliensis* (CEMM 05-3-050) in yeast form formed in the presence of quorum sensing molecules (120 h). LSCM (A - D) and SEM (E - H). A and E: biofilms formed without exposure to drugs. B and F: biofilms formed in the presence of 0.031  $\mu\text{M}$  farnesol. C and G: biofilms formed in the presence of 0.5 mM 2-phenylethanol. D and H: biofilms formed in the presence of 0.5 mM tyrosol. Magnification:  $\times 3,000$  (D - F),  $\times 400$  (A - C). Scale bars: 200  $\mu\text{m}$  (A - C) and 20  $\mu\text{m}$  (D - F). Lasers: 488 nm for detection of SYTO9 and 561 nm for detection of propidium iodide.

**Table 3.** Sessile MICs (SMIC<sub>50</sub>) of quorum sensing molecules against *Sporothrix* species in filamentous and yeast forms.

Species (n)	SMIC <sub>50</sub>			
	Farnesol ( $\mu\text{M}$ )	2-Phenylethanol (mM)	Tyrosol (mM)	Tryptophol (mM)
<i>S. brasiliensis</i> (6)				
F	8-32	8-16	64-128	> 128
Y	1-8	4-16	32-128	> 128
<i>S. globosa</i> (3)				
F	8-32	8-16	64-128	> 128
Y	2-4	8-16	64-128	> 128
<i>S. mexicana</i> (3)				
F	8-16	8-32	64	> 128
Y	1-16	4-16	32-64	> 128
<i>S. schenckii</i> s. str. (3)				
F	8-16	8-32	64-128	> 128
Y	2-4	4-16	32-128	> 128

SMIC<sub>50</sub>: sessile minimum inhibitory concentration that causes 50% inhibition of biofilm metabolic activity, measured by the XTT reduction assay. F: filamentous form. Y: yeast form. Values expressed as a range.

spp. in both filamentous and yeast forms. Farnesol MIC values observed against *Sporothrix* spp. were lower than those obtained in other studies, such as with *Aspergillus fumigatus* where the MIC was > 32,000  $\mu\text{M}$  (Wongsuk and Luplertlop 2020), and *Candida albicans* where farnesol presented a MIC of 56.25  $\mu\text{M}$  (Cordeiro et al. 2013). The present results are in agreement with those observed for other dimorphic fungi, in which farnesol presented a MIC of 0.285  $\mu\text{M}$  against *Coccidioides posadasii* (Brilhante et al. 2013) and 0.01  $\mu\text{M}$  for *Histoplasma capsulatum* (Brilhante et al. 2015a). Diverse authors have suggested that farnesol acts by inhibiting ergosterol

synthesis, causing changes in the cell membrane (Brilhante et al. 2013; Polke et al. 2018), while others refer to apoptosis induction (Wang et al. 2014).

Like farnesol, 2-phenylethanol also showed antifungal activity against the filamentous and yeast forms of *Sporothrix* spp. The antimicrobial effects of 2-phenylethanol have previously been reported against *C. albicans*, *Candida dubliniensis*, *S. cerevisiae*, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Rhizopus* spp. (Findri-Gušteek et al. 2012; Han et al. 2013; Liu et al. 2014). Liu et al. (2014) indicated that the effect of 2-phenylethanol is related to the inhibition of RNA, DNA and protein synthesis, or even to cell metabolism

impairment (Liu et al. 2014). Thus, 2-phenylethanol may interfere with nucleic acid and protein synthesis in the cells of *Sporothrix* spp., limiting cell growth.

The antifungal activity of tyrosol has already been reported in previous studies, with a MIC of 4.2 mM against *Candida* spp. (Jakab et al. 2019), a MIC of 5.5 mM against the filamentous form of *C. posadasii* (Brilhante et al. 2016a), and MICs of 5.9 mM and 0.88 mM for the filamentous and yeast cells of *H. capsulatum*, respectively (Brilhante et al. 2016a). Similar inhibitory concentrations of tyrosol were observed against *Sporothrix* spp. in both filamentous and yeast forms. A study based on the gene expression profile of *C. albicans* showed that tyrosol affected cell cycle regulation, DNA replication, and chromosome segregation (Jakab et al. 2019), which could represent mechanisms of action against *Sporothrix* cells.

In general, the MICs of farnesol, 2-phenylethanol and tyrosol against the yeast form of *Sporothrix* spp. were 2- or 4-fold lower than those obtained for the filamentous form. This difference in susceptibility is common and has been observed in several studies that evaluated both morphological presentations of this fungus (Gutierrez-Galhardo et al. 2010; Sanchotene et al. 2017; Brilhante et al. 2018b). The divergence in susceptibility may be related to the difference in fungal cell wall constituent proportions between the filamentous and yeast forms of *Sporothrix* spp., in particular glucosamine, glucose and  $\beta$ -1,3-glucan (Martínez-Álvarez et al. 2017). The cell wall is an important structure for the growth of fungi since it confers osmotic stability and protects against stress. In addition, this structure is responsible for maintaining the cell shape. Changes in cell wall structure have been related to decreased AMB susceptibility in *Candida* spp. (Mesa-Arango et al. 2016). Thus, it can be hypothesized that differences in the cell wall composition between filamentous and yeast forms of *Sporothrix* spp. may influence the susceptibility to drugs.

Little is known about the mechanisms involved in *Sporothrix* biofilm formation and the quorum sensing activity in this fungal pathogen. However, the role of some QSMs in morphogenesis has been described for other dimorphic fungi from the order Ophiostomatales, such as *Ophiostoma floccosum* and *Ophiostoma piceae* (Berrocal et al. 2014; de Salas et al. 2015). Evaluation of QSMs activity in *Sporothrix* spp. is needed to understand the mechanisms involved in biofilm formation by these species.

The QSMs studied here were first described in *C. albicans* (Wongsuk et al. 2016) and are closely related to the morphological control of this fungal pathogen.

However, other studies have already described different effects of these QSMs on the morphology, biofilm formation and antifungal activity against different fungi (Mehmood et al. 2019), with effects dependent on the fungal species studied (Sebaa et al. 2019). Farnesol, tyrosol, 2-phenylethanol, and tryptophol are frequently studied for their important role in modulating the filamentation and biofilm formation process. In this study, the effects of these four exogenous quorum sensing molecules was investigated on the filamentation and biofilm formation of *Sporothrix* spp. In these experiments, it was opted to use sub-inhibitory concentrations of QSMs to ensure that the alterations observed were not mediated by cell damage.

Exposure to farnesol caused a reduction in filamentation and biofilm formation by *Sporothrix* in the filamentous form. Biofilms formed in the presence of this QSM consisted predominantly of conidia and sparse filaments when observed by CLSM, with no damaged cells observed. In the case of yeast biofilms, no inhibitory effect was observed at sub-inhibitory concentrations of farnesol. Previous studies have shown that farnesol blocks the morphological transition from yeast to hypha, thus preventing biofilm formation in *C. albicans* and *Trichosporon* spp. (Hall et al. 2011; Cordeiro et al. 2019). The reduction in filamentation has also been described in the other dimorphic fungi, such as *Paracoccidioides* spp., reducing germ tube formation by up to 85%, without affecting cell viability (Derengowski et al. 2009). Since the presence of multiple layers of filaments is a hallmark of filamentous biofilms (Harding et al. 2009), it was hypothesized that the reduction observed in *Sporothrix* biofilms is due, in part, to filamentation inhibition by farnesol.

2-Phenylethanol also caused inhibition of filamentation and biofilm formation by *Sporothrix*. Microscopic analysis revealed that biofilms formed in the presence of 2-phenylethanol maintained their cell integrity, as perceived by the absence of cells stained with propidium iodide. 2-Phenylethanol is a QSM that inhibits germ tube and biofilm formation by *C. albicans* (Chen and Fink 2006). These filament inhibitory effects could explain the observed activity of 2-phenylethanol on *Sporothrix*. Previous studies have also shown that several important cell pathways are altered by treatment with 2-phenylethanol, including those of amino acid and protein synthesis, cell cycle and cell death, which communicate and work collaboratively on fungal inhibition (Liu et al. 2014; Pu et al. 2014).

Unlike farnesol and 2-phenylethanol, tyrosol caused an increase in filamentation and in the biomass and

metabolic activity of the filamentous biofilms of *Sporothrix* spp. CLSM revealed the formation of a thicker biofilm in the presence of tyrosol and an increase in filaments, forming a thick mesh of hyphae. Tyrosol stimulates formation of germ tubes, pseudohyphae and biofilms of *C. albicans* (Alem et al. 2006). This effect seems to be dependent on the tyrosol concentration: Cordeiro et al. (2015) reported that exogenous tyrosol added in the biofilm development period of *C. albicans* was able to significantly reduce biofilm formation, instead of stimulating its formation as indicated by Alem et al. (2006). Thus, the increase in *Sporothrix* filamentous biofilm may be due to stimulation of filament production by tyrosol.

Since biofilm formation is a resilience factor for the survival of microorganisms, the antifungal activity of farnesol, 2-phenylethanol, tyrosol and tryptophol was investigated against the mature filamentous and yeast biofilms of *Sporothrix* spp. In this stage of the study, concentrations varying from MIC to  $128 \times \text{MIC}$  from tests with planktonic cells were used. The  $\text{SMIC}_{50}$  values of QSMs were on average 73, 8 and 46 times higher than the MIC values for farnesol, 2-phenylethanol and tyrosol, respectively. This demonstrates an increase in tolerance to this drug when the fungus is in the form of biofilms. This increased tolerance of sessile cells may be related to various features observed in biofilms, such as overexpression of efflux pumps, changes in the general cell physiology, high cell density and the presence of a matrix of extracellular polymeric substances (Borghi et al. 2016).

Different  $\text{SMIC}$  values from those observed in this study can be found in the literature for farnesol against biofilms formed by other fungi. Farnesol reduced the metabolic activity of mature biofilms of *Trichosporon* spp. and *Candida auris* by 50% at concentrations of 300–600 and 150–300  $\mu\text{M}$ , respectively (Cordeiro et al. 2019; Nagy et al. 2020). These results showed higher  $\text{SMIC}$  values than those found against *Sporothrix* spp. in filamentous (8 to 32  $\mu\text{M}$ ) and yeast form (1 to 16  $\mu\text{M}$ ). On the other hand, Brillhante et al. (2015a) reported that farnesol was able to reduce the metabolic activity (>80%) of *H. capsulatum* yeast biofilm at  $\sim 0.05 \mu\text{M}$ . Thus, the effect of farnesol against mature fungal biofilms depends on the species, with a higher anti-biofilm activity observed against dimorphic fungi in the yeast form.

Based on the data presented in this study, it can be concluded that the QSMs farnesol, 2-phenylethanol and tyrosol had antifungal activity against planktonic and sessile cells of the *S. schenckii* species complex in both the filamentous and yeast forms. These molecules had different effects on biofilm formation by

*Sporothrix* spp. Filamentous biofilm formation was inhibited by farnesol and 2-phenylethanol and was stimulated by tyrosol, while yeast biofilm formation was inhibited by 2-phenylethanol and tyrosol. Tryptophol did not affect biofilm formation by *Sporothrix*.

## Acknowledgements

The Analytical Center UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pro-Equipment CAPES for technical support in obtaining scanning electron microscopy images.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

## Funding

This work was supported by the Brazilian agencies National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Grant 305024/2017-5) and Office for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; Brazil; Grant 88881.168799/2018-00).

## ORCID

Anderson Messias Rodrigues  <http://orcid.org/0000-0003-0891-4563>

## References

- Alem MAS, Oteef MDY, Flowers TH, Douglas LJ. 2006. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic Cell*. 5:1770–1779. doi:10.1128/EC.00219-06
- Bernardo SM, Rane HS, Chavez-Dozal A, Lee SA. 2014. Secretion and filamentation are mediated by the *Candida albicans* t-SNAREs Sso2p and Sec9p. *FEMS Yeast Res*. 14:762–775. doi:10.1111/1567-1364.12165
- Berrocal A, Oviedo C, Nickerson KW, Navarrete J. 2014. Quorum sensing activity and control of yeast-mycelium dimorphism in *Ophiostoma floccosum*. *Biotechnol Lett*. 36:1503–1513. doi:10.1007/s10529-014-1514-5
- Borghi E, Borgo F, Morace G. 2016. Fungal biofilms: update on resistance. In: Christine Imbert, editor. *Fungal biofilms related infection*. Switzerland: Springer; p. 37–47.
- Brilhante RSN, Oliveira JS, Evangelista AJD, Serpa R, Silva AL, Aguiar FRM, Pereira VS, Castelo DDS, Pereira-Neto WA, Cordeiro RDA, et al. 2016b. *Candida tropicalis* from veterinary and human sources shows similar in vitro hemolytic activity, antifungal biofilm susceptibility and pathogenesis against *Caenorhabditis elegans*. *Vet Microbiol*. 192:213–219. doi:10.1016/j.vetmic.2016.07.022
- Brilhante RSN, Caetano ÉP, Lima RACD, Marques FJDF, Castelo-Branco DDSCM, Melo CVSD, Guedes GMDM, Oliveira JSD, Camargo ZPD, Moreira JLB, et al. 2016a. Terpinen-4-ol, tyrosol, and  $\beta$ -lapachone as potential

- antifungals against dimorphic fungi. *Brazilian J Microbiol.* 47:917–924. doi:10.1016/j.bjm.2016.07.015
- Brilhante RSN, de Aguiar FRM, da Silva MLQ, de Oliveira JS, de Camargo ZP, Rodrigues AM, Pereira VS, Serpa R, Castelo-Branco D, de S C M, Correia EEM, et al. 2018a. Antifungal susceptibility of *Sporothrix schenckii* complex biofilms. *Med Mycol.* 56:297–306. doi:10.1093/mmy/myx043
- Brilhante RSN, de Lima RAC, Caetano EP, Leite JGG, Castelo-Branco DDSCM, Ribeiro JF, Bandeira TDJPG, Cordeiro RDA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, et al. 2013. Effect of farnesol on growth, ergosterol biosynthesis, and cell permeability in *Coccidioides posadasii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:2167–2170. doi:10.1128/AAC.02457-12
- Brilhante RSN, de Lima RAC, Marques FJDF, Silva NF, Caetano ÉP, Castelo-Branco DDSCM, Bandeira TDJPG, Moreira JLB, Cordeiro RDA, Monteiro AJ, et al. 2015a. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. *J Med Microbiol.* 64:394–399. doi:10.1099/jmm.0.000030
- Brilhante RSN, Pereira VS, Oliveira JD, Lopes RGP, Rodrigues AM, de Camargo ZP, Pereira-Neto WDA, Castelo-Branco D, Cordeiro RDA, Sidrim JJC, et al. 2018b. Pentamidine inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. *Future Microbiol.* 13:1129–1140. doi:10.2217/fmb-2018-0070
- Brilhante RSN, Silva NF, Marques FJDF, Castelo-Branco DDSCM, de Lima RAC, Malaquias ADM, Caetano EP, Barbosa GR, de Camargo ZP, Rodrigues AM, et al. 2015b. In vitro inhibitory activity of terpenic derivatives against clinical and environmental strains of the *Sporothrix schenckii* complex. *Med Mycol.* 53:93–98. doi:10.1093/mmy/myu085
- Chen H, Fink GR. 2006. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev.* 20:1150–1161. doi:10.1101/gad.1411806
- CLSI. 2017a. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. 3rd ed. CLSI document M38ed3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. 2017b. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 4th ed. CLSI document M27ed4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards.
- Cordeiro RA, Teixeira CEC, Brilhante RSN, Castelo-Branco DDSCM, Paiva MAN, Giffoni Leite JJ, Lima DT, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG. 2013. Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. *Med Mycol.* 51:53–59. doi:10.3109/13693786.2012.692489
- Cordeiro RDA, Nogueira GC, Brilhante RSN, Teixeira CEC, Mourão CI, Castelo-Branco DDSCM, Paiva MDAN, Ribeiro JF, Monteiro AJ, Sidrim JJC, et al. 2012. Farnesol inhibits in vitro growth of the *Cryptococcus neoformans* species complex with no significant changes in virulence-related exoenzymes. *Vet Microbiol.* 159:375–380. doi:10.1016/j.vetmic.2012.04.008
- Cordeiro RDA, Pereira LMG, de Sousa JK, Serpa R, Andrade ARC, Portela FVM, Evangelista AJDJ, Sales JA, Aguiar ALR, Mendes PBL, et al. 2019. Farnesol inhibits planktonic cells and antifungal-tolerant biofilms of *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin*. *Med Mycol.* 57:1038–1045. doi:10.1093/mmy/myy160
- Cordeiro RDA, Teixeira CEC, Brilhante RSN, Castelo-Branco DDSCM, Alencar LP, de Oliveira JS, Monteiro AJ, Bandeira TJPG, Sidrim JJC, Moreira JLB, et al. 2015. Exogenous tyrosol inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* species and enhances their susceptibility to antifungals. *FEMS Yeast Res.* 15:fov012. doi:10.1093/fem-syr/fov012
- de Salas F, Martínez MJ, Barriuso J. 2015. Quorum-sensing mechanisms mediated by farnesol in *Ophiostoma piceae*: effect on secretion of sterol esterase. *Appl Environ Microbiol.* 81:4351–4357. doi:10.1128/AEM.00079-15
- Derengowski LS, De-Souza-Silva C, Braz SV, Mello-De-Sousa TM, Bão SN, Kyaw CM, Silva-Pereira I. 2009. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 8:13. doi:10.1186/1476-0711-8-13
- Findri-Guštek S, Petek MJ, Sarajlija H, Mršić G, Džepina AM, Oreščanin V. 2012. The correlation of the lifestyle and medical conditions with the vaginal infections and production of 2-phenylethanol. *Arch Gynecol Obstet.* 286:671–682. doi:10.1007/s00404-012-2346-y
- Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM, Monzón A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. 2010. Antifungal susceptibility profile in vitro of *Sporothrix schenckii* in two growth phases and by two methods: microdilution and E-test. *Mycoses.* 53:227–231. doi:10.1111/j.1439-0507.2009.01701.x
- Hall RA, Turner KJ, Chaloupka J, Cottier F, De Sordi L, Sanglard D, Levin LR, Buck J, Mühlischlegel FA. 2011. The quorum-sensing molecules farnesol/homoserine lactone and dodecanol operate via distinct modes of action in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell.* 10:1034–1042. doi:10.1128/EC.05060-11
- Han T-L, Tumanov S, Cannon RD, Villas-Boas SG. 2013. Metabolic response of *Candida albicans* to phenylethyl alcohol under hyphae-inducing conditions. *PLoS One.* 8:e71364. doi:10.1371/journal.pone.0071364
- Harding MW, Marques LLR, Howard RJ, Olson ME. 2009. Can filamentous fungi form biofilms? *Trends Microbiol.* 17:475–480. doi:10.1016/j.tim.2009.08.007
- Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology.* 146:2395–2407. doi:10.1099/00221287-146-10-2395
- Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P, Nickerson KW. 2001. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol.* 67:2982–2992. doi:10.1128/AEM.67.7.2982-2992.2001
- Jakab Á, Tóth Z, Nagy F, Nemes D, Bácskay I, Kardos G, Emri T, Pócsi I, Majoros L, Kovács R. 2019. Physiological and transcriptional responses of *Candida parapsilosis* to exogenous tyrosol. *Appl Environ Microbiol.* 85:e01388. doi:10.1128/AEM.01388-19
- Lindsay AK, Deveau A, Piispanen AE, Hogan DA. 2012. Farnesol and cyclic AMP signaling effects on the

- hypha-to-yeast transition in *Candida albicans*. Eukaryotic Cell. 11:1219–1225. doi:10.1128/EC.00144-12
- Liu P, Cheng Y, Yang M, Liu Y, Chen K, Long C, Deng X. 2014. Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium molds* of citrus fruits. BMC Microbiol. 14:242doi:10.1186/s12866-014-0242-2
- Lopes-Bezerra LM, Mora-Montes HM, Zhang Y, Nino-Vega G, Rodrigues AM, De Camargo ZP, De Hoog S. 2018. Sporotrichosis between 1898 and 2017: the evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. Med Mycol. 56:126–S143. doi:10.1093/mmy/myx103
- Martínez-Alvarez JA, Pérez-García LA, Mellado-Mojica E, López MG, Martínez-Duncker I, López-Bezerra LM, Mora-Montes HM. 2017. *Sporothrix schenckii sensu stricto* and *Sporothrix brasiliensis* are differentially recognized by human peripheral blood mononuclear cells. Front Microbiol. 8:843. doi:10.3389/fmicb.2017.00843
- Mehmood A, Liu G, Wang X, Meng G, Wang C, Liu Y. 2019. Fungal quorum-sensing molecules and inhibitors with potential antifungal activity: a review. Molecules. 24:1950. doi:10.3390/molecules24101950
- Mesa-Arango AC, Rueda C, Román E, Quintin J, Terrón MC, Luque D, Netea MG, Pla J, Zaragoza O. 2016. Cell wall changes in amphotericin B-resistant strains from *Candida tropicalis* and relationship with the immune responses elicited by the host. Antimicrob Agents Chemother. 60:2326–2335. doi:10.1128/AAC.02681-15
- Nagy F, Vitális E, Jakab A, Borman AM, Forgács L, Tóth Z, Majoros L, Kovács 2020. In vitro and in vivo effect of exogenous farnesol exposure against *Candida auris*. Front Microbiol. 11:Article 957, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2020.00957
- Padder SA, Prasad R, Shah AH. 2018. Quorum sensing: a less known mode of communication among fungi. Microbiol Res. 210:51–58. doi:10.1016/j.micres.2018.03.007
- Paluch E, Rewak-Soroczyńska J, Jędrusik I, Mazurkiewicz E, Jermakow K. 2020. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. Appl Microbiol Biotechnol. 104:1871–1811. doi:10.1007/s00253-020-10349-w
- Polke M, Leonhardt I, Kurzai O, Jacobsen ID. 2018. Farnesol signalling in *Candida albicans* - more than just communication. Crit Rev Microbiol. 44:230–243. doi:10.1080/1040841X.2017.1337711
- Pu L, Jingfan F, Kai C, Chao-An L, Yunjiang C. 2014. Phenylethanol promotes adhesion and biofilm formation of the antagonistic yeast *Kloeckera apiculata* for the control of blue mold on citrus. FEMS Yeast Res. 14:536–546. doi:10.1111/1567-1364.12139
- Ramírez-Soto MC, Aguilar-Ancori EG, Tirado-Sánchez A, Bonifaz A. 2018. Ecological determinants of sporotrichosis etiological agents. JoF. 4:95. doi:10.3390/jof4030095
- Rodrigues CF, Černáková L. 2020. Farnesol and tyrosol: secondary metabolites with a crucial quorum-sensing role in *Candida* biofilm development. Genes (Basel). 11:444. doi:10.3390/genes11040444
- Rodrigues AM, de Hoog S, de Camargo ZP. 2013a. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. Med Mycol. 51:405–412. doi:10.3109/13693786.2012.719648
- Rodrigues AM, Teixeira M de M, de Hoog GS, Schubach TMP, Pereira SA, Fernandes GF, Bezerra LML, Felipe MS, de Camargo ZP. 2013b. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. PLoS Negl Trop Dis. 7:e2281doi:10.1371/journal.pntd.0002281
- Sanhotene KO, Brandolt TM, Klafke GB, Poester VR, Xavier MO. 2017. In vitro susceptibility of *Sporothrix brasiliensis*: comparison of yeast and mycelial phases. Med Mycol. 55:869–876. doi:10.1093/mmy/myw143
- Sebaa S, Boucherit -Otmani Z, Courtois P. 2019. Effects of tyrosol and farnesol on *Candida albicans* biofilm. Mol Med Rep. 19:3201–3209.
- Singh MP, Singh P, Li H-B, Song Q-Q, Singh RK. 2020. Microbial biofilms: development, structure, and their social assemblage for beneficial applications. In: Mukesh Kumar Yadav, Bhim Pratap Singh, editors. New and future developments in microbial biotechnology and bio-engineering: microbial biofilms. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; p. 125–138.
- Singkum P, Muangkaew W, Suwanmanee S, Pumeesat P, Wongsuk T, Luplertlop N. 2019. Suppression of the pathogenicity of *Candida albicans* by the quorum-sensing molecules farnesol and tryptophol. J Gen Appl Microbiol. 65:2012–2018. doi:10.2323/jgam.2018.12.002
- Wang X, Wang Y, Zhou Y, Wei X. 2014. Farnesol induces apoptosis-like cell death in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. Mycologia. 106:881–888. doi:10.3852/13-292
- Wongsuk T, Luplertlop N. 2020. Effect of quorum sensing molecules on *Aspergillus fumigatus*. Walailak J Sci Technol. 17:348–358.
- Wongsuk T, Pumeesat P, Luplertlop N. 2016. Fungal quorum sensing molecules: role in fungal morphogenesis and pathogenicity. J Basic Microbiol. 56:440–447. doi:10.1002/jobm.201500759
- Xia J, Qian F, Xu W, Zhang Z, Wei X. 2017. In vitro inhibitory effects of farnesol and interactions between farnesol and antifungals against biofilms of *Candida albicans* resistant strains. Biofouling. 33:283–293. doi:10.1080/08927014.2017.1295304
- Zhang J, Feng T, Wang J, Wang Y, Zhang X-H. 2019. The Mechanisms and applications of quorum sensing (QS) and quorum quenching (QQ). J Ocean Univ China. 18:1427–1442. doi:10.1007/s11802-019-4073-5

## APÊNDICE C – Certificado de Registro de Programa de Computador



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
MINISTÉRIO DA ECONOMIA  
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
DIRETORIA DE PATENTES, PROGRAMAS DE COMPUTADOR E TOPOGRAFIAS DE CIRCUITOS INTEGRADOS

## Certificado de Registro de Programa de Computador

Processo Nº: **BR512020001311-2**

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial expede o presente certificado de registro de programa de computador, válido por 50 anos a partir de 1º de janeiro subsequente à data de 01/07/2020, em conformidade com o §2º, art. 2º da Lei 9.609, de 19 de Fevereiro de 1998.

**Título:** QUANTYFILM

**Data de publicação:** 01/07/2020

**Data de criação:** 02/01/2020

**Titular(es):** VANDBERGUE SANTOS PEREIRA

**Autor(es):** VANDBERGUE SANTOS PEREIRA; RAIMUNDA SÂMIA NOGUEIRA BRILHANTE; MARCOS FÁBIO GADELHA ROCHA; WALDEMIRO AQUINO PEREIRA NETO; JOSÉ JÚLIO COSTA SIDRIM

**Linguagem:** JAVA

**Campo de aplicação:** BL-01; FQ-12; SD-09

**Tipo de programa:** FA-01

**Algoritmo hash:** SHA-256

**Resumo digital hash:** 56A9DB6F3E4C19553B8BF5A9632C7F9D2977CBFB6BE946F2AA2C93872F22AA55

**Expedido em:** 14/07/2020

**Aprovado por:**

Helmar Alvares

Chefe da DIPTO - Portaria/INPI/DIRPA Nº 09, de 01 de julho de 2019

**APÊNDICE D** - Lista de publicações em periódicos científicos (2018-2021)**Publicações com *Sporothrix* spp.**

1- BRILHANTE, RSN; AGUIAR, FRM; SILVA, MLQ; OLIVEIRA, JS; DE CAMARGO, ZP; RODRIGUES, AM; **PEREIRA, VS**; SERPA, R; CASTELO-BRANCO, DSCM; CORREIA, EEM; PEREIRA-NETO, WA; CORDEIRO, RA; ROCHA, MFG; SIDRIM, JJC. Antifungal susceptibility of *Sporothrix schenckii* complex biofilms. *Medical Mycology*, v. 56, p. 297-306, 2018. <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myx043>.

2- BRILHANTE, RSN; SILVA, MLQ; **PEREIRA, VS**; OLIVEIRA, JS; MACIEL, JM; SILVA, ING; GARCIA, LGS; GUEDES, GMM; CORDEIRO, RA; PEREIRA-NETO, WA; DE CAMARGO, ZP; RODRIGUES, AM; SIDRIM, JJC; CASTELO-BRANCO, DSCM; ROCHA, MFG. Potassium iodide and miltefosine inhibit biofilms of *Sporothrix schenckii* species complex in yeast and filamentous forms. *Medical Mycology*, v. 57, p. 764-72, 2018. <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myy119>.

3- BRILHANTE, RSN; **PEREIRA, VS**; OLIVEIRA, JS; LOPES, RGP; RODRIGUES, AM; DE CAMARGO, ZP; PEREIRA-NETO, WA; CASTELO-BRANCO, DSCM; CORDEIRO, RA; SIDRIM, JJC; ROCHA, MFG. Pentamidine inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. *Future Microbiology*, v. 13, p. 10, 2018. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0070>.

4- BRILHANTE, RSN; **PEREIRA, VS**; OLIVEIRA, JS; RODRIGUES, AM; CAMARGO, ZP; PEREIRA-NETO, WA; NASCIMENTO, NRF; CASTELO-BRANCO, DSCM; CORDEIRO, RA; SIDRIM, JJC; ROCHA, MFG. Terpinen-4-ol inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. *Future Microbiology*, v. 14, p. 1221–1233, 2019. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb-2019-0146>.

5- BRILHANTE, RSN; FONSECA, XMQC; **PEREIRA, VS**; ARAÚJO, GS; OLIVEIRA, JS; GARCIA, LGS; RODRIGUES, AM; CAMARGO, ZP; PEREIRA-NETO, WA; CASTELO-BRANCO, DSCM; CORDEIRO, RA; SIDRIM, JJC; ROCHA, MFG. In vitro inhibitory effect of statins on planktonic cells and biofilms of the *Sporothrix schenckii* species complex. *Journal of Medical Microbiology*, v. 69, p. 1-6, 2020. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.001195>.

6- BRILHANTE, RSN; COSTA, AC; **PEREIRA, VS**; FERNANDES, MR; OLIVEIRA, JS; RODRIGUES, AM; CAMARGO, ZP; PEREIRA-NETO, WA; SIDRIM, JJC; ROCHA, MFG. Antifungal activity of deferiprone and EDTA against *Sporothrix* spp.: Effect on planktonic growth and biofilm formation. *Medical Mycology*, 2020. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa073>.

7- BRILHANTE, RSN; FERNANDES, MR; **PEREIRA, VS**; CUNHA, AC; OLIVEIRA, JS; DE AGUIAR, L; RODRIGUES, AM; DE CAMARGO, ZP; PEREIRA-NETO, WA; SIDRIM, JJC; ROCHA, MFG. Biofilm formation on cat claws by *Sporothrix* species: An ex vivo model. *Microbial Pathogenesis*, v. 150, p. 104670, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104670>.

8- BRILHANTE, RSN; **PEREIRA, VS**; NOBRE, AFD; OLIVEIRA, JS; FERNANDES, MR; COSTA, AC; RODRIGUES, AM; CAMARGO, ZP; PEREIRA-NETO, WA; SIDRIM, JJC; ROCHA, MFG. Exogenous fungal quorum sensing molecules inhibit planktonic cell growth and modulate filamentation and biofilm formation in the *Sporothrix schenckii* complex. *Biofouling*, v. 36, p. 909-921, 2020. <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1828373>.