



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

AUGUSTO FEYNMAN DIAS NOBRE

**EFEITO DE INIBIDORES DE BOMBA DE PRÓTONS SOBRE A SENSIBILIDADE E
MELANOGÊNESE DE *Sporothrix* spp.**

FORTALEZA-CE

2023

AUGUSTO FEYNMAN DIAS NOBRE

EFEITO DE INIBIDORES DE BOMBA DE PRÓTONS SOBRE A SENSIBILIDADE E
MELANOGÊNESE DE *Sporothrix* Spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias.

Orientadora: Prof. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

FORTALEZA-CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N671e Nobre, Augusto Feynman Dias.
Efeito de inibidores de bomba de prótons sobre a sensibilidade e melanogênese de *Sporothrix* spp. /
Augusto Feynman Dias Nobre. – 2023.
66 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.
1. Esporotricose. 2. Biofilmes. 3. Melanina. 4. Omeprazol. 5. Micologia. I. Título.
- CDD 610
-

AUGUSTO FEYNMAN DIAS NOBRE

EFEITO DE INIBIDORES DE BOMBA DE PRÓTONS SOBRE A SENSIBILIDADE E
MELANOGÊNESE DE *Sporothrix* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias.

Aprovada em: 24/04/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dra. Germana Costa Paixão
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A todos que me permitiram alcançar esse momento.

Aos meus pais, Ivanisa e Augusto.

Aos meus avós.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro

À Universidade Federal do Ceará (UFC) pelo espaço e infraestrutura disponibilizados.

Ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) pelos recursos físicos e humanos destinados para concretização deste trabalho.

À Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante por ter me recebido no laboratório para a iniciação científica e mestrado. Por toda a atenção, profissionalismo, dedicação e cuidado que tem com os alunos. Sou grato por ter parte da minha jornada acadêmica com a senhora como orientadora.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha por todo conhecimento, esmero e ideias na elaboração dos artigos científicos.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências médicas (PPGCM) que contribuíram para minha formação acadêmica e científica.

A Todas as pessoas que fazem parte do CEMM, pelo companheirismo, ensinamentos e ajuda ao longo dessa jornada.

Aos meus pais Ivanisa e Augusto por todos os ensinamentos, orientações e cuidados ao longo da vida. Sou o que sou hoje graças a vocês.

Aos meus avós que já não estão mais presentes nesse mundo, mas que sempre tiveram muito carinho, cuidado e confiança em mim, agradeço vocês por tudo.

Aos meus irmãos Werner, Marília e Vinícius, Agradeço a todos os momentos de amizade e aprendizado que a vida nos permitiu viver juntos, sou feliz por ter tido a oportunidade de participar do crescimento e formação de vocês

A todos os outros familiares que me ajudaram ou torceram por mim durante a minha vida, vocês também fazem parte disso.

A Waleska Fernandes, por me acompanhar ao longo dos últimos 8 anos e sempre me apoiar, cuidar e dividir sonhos e desejos. Agradeço a todos os momentos engraçados e felizes que passamos juntos. Você me inspira a ser sempre melhor e espero que eu consiga atender a suas expectativas.

Ao Anderson Costa pela amizade que foi além do laboratório, por todo a parceria, momentos engraçados, suporte e confiança ao longo dessa caminhada. Sou grato pela amizade que tenho com você

A Mirele Fernandes por todo apoio, ensinamentos, ajuda e amizade durante esse tempo, sou muito grato por toda a ajuda e pelos momentos que vivemos juntos.

A Vandbergue pela parceria ao me apresentar o laboratório e pelos projetos que vivemos juntos, além da amizade que se seguiu além do laboratório

Ao Jonathas pelos ensinamentos no laboratório, pela amizade e pelo prazer compartilhados pelo virtual.

A Delano, Matheus Silva, Amaury, Jefte e Leonardo, a amizade de vocês torna a caminhada da vida menos árdua e mais divertida, e agradeço por tudo.

Aos amigos de Malaquias, por caminharem comigo durante o início da jornada academia, essa conquista também é por vocês.

Aos amigos que ganhei ao longo dessa jornada e participaram da minha história.

A qualquer pessoa que eu possa não ter citado mas que torceu, ajudou e participou da minha vida, eu sou muito grato a você.

“A ciência é aquilo que aprendemos sobre
como não deixar enganar a nós mesmos.”

Richard Feynman

RESUMO

A esporotricose é uma infecção subcutânea causada por fungos dimórficos pertencentes ao clado clínico de *Sporothrix* spp. Os fungos possuem diversos fatores de virulência, como a formação de biofilmes e a produção de melanina, que contribuem para sua sobrevivência no hospedeiro e no ambiente. A utilização de inibidores da bomba de prótons já demonstrou inibir o crescimento e a melanogênese de outros fungos. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos inibidores de bomba de prótons (IBPs) omeprazol (OMP), rabeprazol (RBP), lansoprazol (LSP), esomeprazol (ESP) e pantoprazol (PTP) sobre a sensibilidade e melanogênese de *Sporothrix* spp., bem como suas interações com antifúngicos de uso clínico. Foram utilizadas 12 cepas de *Sporothrix* spp. (6 *Sporothrix brasiliensis*, 3 *Sporothrix globosa* e 3 *Sporothrix schenckii*). A atividade antifúngica dos IBPs foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo. O efeito da combinação dos IBPs com os antifúngicos anfotericina B, itraconazol e terbinafina foi realizada pelo método checkerboard. A ação dos IBPs no biofilme de *Sporothrix* spp. foi analisada pelos métodos de coloração com cristal violeta e ensaio de redução do MTT. A ação dos IBPs no processo de melanogênese foi realizado pela escala de cinza, verificando a porcentagem de preto. OMP e RBP apresentaram os melhores resultados de concentração inibitória mínima (CIM), variando de 32 a 256 µg/ml para OMP e 32 a 128 µg/ml para RBP. Os biofilmes se mostraram sensíveis ao OMP e RBP, com redução ($p < 0,05$) da atividade metabólica em 52% para OMP e 50% para RBP na concentração de 512 µg/ml, e da biomassa em 53% para OMP e 51% para RBP nas concentrações de 512 µg/ml. Já a inibição da melanogênese, apenas o OMP demonstrou inibição, com redução de 54% na escala de cinza. Conclui-se que os inibidores da bomba de prótons OMP e RBP possuem atividade antifúngica frente células planctônicas e biofilmes de *Sporothrix* spp., além de OMP apresentar atividade inibitória da melanogênese destes fungos.

Palavras-chave: Esporotricose; Biofilmes; Melanina; Omeprazol; Rabeprazol; Micologia.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous infection caused by dimorphic fungi belonging to the clinical clade of *Sporothrix* spp. Fungi have several virulence factors, such as biofilm formation and melanin production, which contribute to their survival in the host and in the environment. The use of proton pump inhibitors has already been shown to inhibit the growth and melanogenesis of other fungi. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of the proton pump inhibitors (PPIs) omeprazole (OMP), rabeprazole (RBP), lansoprazole (LSP), esomeprazole (ESP) and pantoprazole (PTP) on the sensitivity and melanogenesis of *Sporothrix* spp., as well as their interactions with clinically used antifungals. Twelve strains of *Sporothrix* spp. (6 *Sporothrix brasiliensis*, 3 *Sporothrix globosa* and 3 *Sporothrix schenckii*). The antifungal activity of PPIs was evaluated by the broth microdilution method. The effect of the combination of PPIs with the antifungals amphotericin B, itraconazole and terbinafine was performed using the checkerboard method. The action of PPIs on the *Sporothrix* spp. was analyzed by crystal violet staining and MTT reduction assay methods. The action of PPIs in the melanogenesis process was carried out using the gray scale, verifying the percentage of black. OMP and RBP showed the best minimum inhibitory concentration (MIC) results, ranging from 32 to 256 µg/ml for OMP and 32 to 128 µg/ml for RBP. Biofilms were sensitive to OMP and RBP, with a reduction ($p < 0,05$) in metabolic activity of 52% for OMP and 50% for RBP at a concentration of 512 µg/ml, and of biomass by 53% for OMP and 51% for RBP at concentrations of 512 µg/ml. As for the inhibition of melanogenesis, only OMP showed inhibition, with a 54% reduction in the gray scale. It concludes that the proton pump inhibitors OMP and RBP have antifungal activity against planktonic cells and biofilms of *Sporothrix* spp., in addition to OMP presenting inhibitory activity of the melanogenesis of these fungi.

Keywords: Sporotrichosis; Biofilms; Melanin; Omeprazole; Rabeprazole; Mycology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- <i>Sporothrix</i> spp. na forma filamentosa.....	18
Figura 2	- <i>Sporothrix</i> spp. na forma leveduriforme.....	19
Figura 3	- Epidemiologia de <i>Sporothrix</i> spp.....	24
Figura 4	- Cronologia de importantes eventos históricos e epidemiológicos da esporotricose.....	26
Figura 5	- Listagem de espécies causadoras da esporotricose e sua patogenicidade.....	27
Figura 6	- Esquema representativo das rotas de transmissão da esporotricose.....	28
Figura 7	- Forma linfocutânea da esporotricose.....	29
Figura 8	- Forma cutânea fixa da esporotricose.....	30
Figura 9	- Forma cutânea disseminada da esporotricose.....	30
Figura 10	- Estrutura dos inibidores da bomba de prótons.....	37
Figura 11	- Atividade metabólica e biomassa de biofilmes de <i>Sporothrix</i> spp.....	47
Figura 12	- Efeito do Omeprazol e Rabeprazol na inibição da produção de melanina em espécies de <i>Sporothrix</i> spp.....	48
Figura 13	- Efeito do sulfato de cobre na inibição da produção de melanina pelo omeprazol em espécies de <i>Sporothrix</i> spp.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Origem de isolamento das cepas de espécies do clado clínico de <i>Sporothrix</i> spp. utilizados nesse estudo.....	41
Tabela 2 – Concentração inibitória mínima dos inibidores da bomba de prótons frente as espécies de <i>Sporothrix</i> spp. na forma filamentosa.....	45
Tabela 3 – Concentração inibitória mínima dos OMP combinado com os antifúngicos frente as espécies de <i>Sporothrix</i> spp. na forma filamentosa.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PDA	Potato Dextrose Agar
BHI	Brain Heart Infusion
KOH	Hidróxido de Potássio
PAS	Ácido periódico-Schiff
GMS	Metenamina de Prata de Grocott-Gomori
PCR	Reação em cadeia da polimerase
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
UFC	Universidade Federal do Ceará
OMP	Omeprazol
RBP	Rabeprazol
LSP	Lansoprazol
ESP	Esomeprazol
PTP	Pantoprazol
ITC	Itraconazol
TRB	Terbinafina
AMB	Anfotericina B
ROS	Espécies reativas de oxigênio
NO	Óxido nítrico
SIN	Sinergismo
IND	Indiferente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Aspectos históricos da esporotricose.....	16
2.2	Morfologia.....	18
2.3	Fatores de virulência.....	20
2.3.1	<i>Melaninas</i>	20
2.3.2	<i>Formação de biofilmes</i>	22
2.4	Epidemiologia.....	22
2.5	Esporotricose.....	26
2.5.1	<i>Patogenia</i>	26
2.5.2	<i>Apresentações clínicas</i>	29
2.5.3	<i>Diagnóstico laboratorial</i>	31
2.5.4	<i>Tratamento</i>	34
2.6	A busca por novas estratégias terapêuticas e o redirecionamento de fármacos.....	35
2.6.1	<i>Os inibidores da bomba de prótons</i>	36
3	HIPÓTESES.....	39
4	OBJETIVOS.....	40
4.1	Objetivo geral.....	40
4.2	Objetivos específicos.....	40
5	METODOLOGIA	41
5.1	Local de estudo	41
5.2	Microrganismos	41
5.3	Antifúngicos e Inibidores da Bomba de Prótons	42
5.4	Teste de sensibilidade em células planctônicas e biofilmes	42
5.5	Ensaio de combinação de drogas - <i>Checkerboard</i>	43
5.6	Melanização de células planctônicas de <i>Sporothrix</i> spp.	43
5.7	Efeito dos inibidores de bombas de prótons na melanização de <i>Sporothrix</i> spp.	43
5.8	Melanização na presença de cobre e de inibidores da bomba de prótons.....	44
5.9	Análises estatísticas	44

6	RESULTADOS	45
6.1	Teste de sensibilidade em células planctônicas	45
6.2	Ensaio de combinação de drogas – <i>checkerboard</i>	45
6.3	Teste de sensibilidade em biofilmes	46
6.4	Efeito dos inibidores de bombas de prótons na melanização de <i>Sporothrix</i> spp.	46
6.5	Melanização na presença de cobre e de inibidores da bomba de prótons	47
7	DISCUSSÃO	50
8	CONCLUSÃO	54
9	PERSPECTIVAS	54
10	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma infecção cosmopolita, subaguda ou crônica, causada por fungos dimórficos pertencentes ao clado clínico de *Sporothrix* spp. Dentre as espécies presentes no clado clínico, podemos citar *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa*, que estão entre as mais descritas como causadoras da esporotricose. A infecção acontece em humanos e outros mamíferos como gatos, cães e camundongos (RODRIGUES et al., 2020). A esporotricose possui maior parte dos casos relatados em regiões de clima tropical e subtropical, sendo considerada endêmica das Américas, tendo prevalência na região sudeste e mais recentemente, na região nordeste do Brasil (GREMIÃO et al., 2022 RODRIGUES et al., 2022).

Os fungos do gênero *Sporothrix* possuem diversos fatores de virulência, como a formação de biofilmes e a produção de melanina, que contribuem para sua sobrevivência no hospedeiro e no ambiente (TAMEZ-CASTRELLÓN et al., 2020).

A melanina é um pigmento que varia do castanho até preto. Os fungos produtores de melanina são mais resistentes às condições impostas durante a interação patógeno-hospedeiro, em paralelo com sua resistência aumentada a condições ambientais adversas (SMITH; CASADEVALL, 2019) e a agentes antifúngicos, como já demonstrado nos patógenos *Histoplasma capsulatum* (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002), *Paracoccidioides brasiliensis* (BALTAZAR et al., 2015) e *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* (BRILHANTE et al., 2019).

Outro fator de virulência importante são os biofilmes, que vêm sendo apontados como uma forma de adaptação dos microrganismos, sendo, portanto, uma importante estratégia de sobrevivência nos mais diversos ambientes (BATTIN et al., 2016). No hospedeiro, os biofilmes microbianos podem participar no desenvolvimento da infecção e dessa forma podem conferir resistência aos mediadores específicos da resposta imune e terapia antimicrobiana convencional (MARTINEZ; CASADEVALL, 2015). A descoberta da formação de biofilmes por espécies de *Sporothrix* spp. é recente, tendo seu primeiro relato realizado por Sánchez-Herrera et al. (2014) quanto à forma filamentosa do fungo. Mais recentemente os estudos de Brilhante et al. (2017) e Brilhante et al. (2019) agregaram novas informações quanto a cinética de formação do biofilme tanto pela forma filamentosa quanto pela forma leveduriforme de *Sporothrix* spp.

Para o tratamento da esporotricose, os fármacos mais utilizados são o iodeto de potássio, terbinafina, itraconazol e em casos mais graves da infecção, a anfotericina B (OROFINO-COSTA et al., 2017; RODRIGUES; HAGEN; DE CAMARGO, 2022). Contudo, a baixa variedade de drogas disponíveis para tratamento, os casos de falhas terapêuticas já existentes e

o aumento de casos de esporotricose no Brasil, alcançando estados da região nordeste como Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e, mais recentemente, o estado do Ceará; e no mundo traz a necessidade de se buscar novas drogas para o combate de tal infecção. Ensaio evidenciam que alguns fármacos utilizados para terapias de doenças não-fúngicas, podem ter atividade antifúngica relevante (RODRIGUES et al., 2022).

Os inibidores da bomba de prótons (IBPs) são medicamentos utilizados para o tratamento de distúrbios de secreção de ácidos gastrointestinais. Além da sua função, estudos desenvolvidos por Baek e Lee (2015) e Matsui et al. (2015), mostram efeito na inibição da melanogênese em melanócitos tratados com IBPs. A inibição da melanogênese pelos inibidores de bombas de prótons pode ser causada devido à inibição da atividade da tirosinase, atividade quelante do cobre, bloqueio do transporte de cobre ou regulação negativa dos genes associados à melanogênese (BAEK; LEE, 2015; MATSUI et al., 2015).

Em estudos realizados por Brilhante et al. (2017) e Brilhante et al. (2019), foi observado que a produção de melanina é inibida em cepas de *Cryptococcus* spp. tratadas com IBPs, além de terem seu crescimento celular reduzido. Estudos demonstraram sua atividade antifúngica em *Candida albicans* (KUMML et al., 2013), *Aspergillus niger* e *Trichophyton rubrum* (JUWAIED et al., 2011).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos inibidores de bomba de prótons sobre a sensibilidade e melanogênese frente a *Sporothrix* spp., bem como suas interações com antifúngicos de uso clínico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos históricos da esporotricose

Em 1898, um paciente do sexo masculino de 36 anos deu entrada no Johns Hopkins Hospital e foi atendido pelo médico Benjamin Robinson Schenck, que observou que o paciente apresentava nódulos com ulcerações presentes do dedo até seu antebraço. Schenck foi o responsável por fazer a coleta e isolamento o patógeno, e a partir desse material foi possível avaliar e realizar sua classificação como pertencente ao gênero *Sporotrichum*. Schenck fez a primeira descrição da esporotricose em sua publicação, sendo ela considerada o primeiro relato da doença e do fungo na literatura (SCHENCK, 1898; GREMIÃO, 2020).

Já no ano seguinte, em 1899, Hektoen e Perkins atenderam um paciente de 5 anos, que havia se machucado com um martelo em casa 10 dias antes. O paciente apresentava alguns abscessos cutâneos, de onde foi coletado e isolado o mesmo microrganismo observado e descrito por Schenck e que depois acabaram por regredir espontaneamente. Estes pesquisadores foram os responsáveis por propor a criação do gênero *Sporothrix* (HEKTOEN; PERKINS, 1900; OROFINO-COSTA et al, 2017).

Apesar de já em 1899 Hektoen e Perkins terem proposto a criação do gênero *Sporothrix* (HEKTOEN; PERKINS, 1900), esses fungos continuaram classificados de forma incorreta no gênero *Sporotrichum* até 1962, quando o pesquisador Carmichael realizou estudos de diferenciação morfológica e observou que existiam diferenças claras na estrutura dos conídios de espécies do gênero *Sporotrichum* e de isolados de casos de esporotricose, passando assim a se utilizar, de fato, o gênero *Sporothrix* (CARMICHAEL, 1962; RIPPON, 1988).

O primeiro caso na Europa foi descrito logo em seguida, em 1903, e ao longo dos 10 anos seguintes mais de 200 casos foram reportados no continente (MARIAT, 1968). O primeiro caso de esporotricose no Brasil foi observado pela primeira vez em 1907, por Lutz e Splendore, que coletaram e isolaram fungos do gênero *Sporothrix* que estavam presentes em ratos (LUTZ; SPLENDORE, 1907). O mesmo Splendore, em 1908, observou e descreveu os corpos asteroides, um achado que também pode ocorrer em casos de esporotricose (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). Em 1909 foi demonstrado que felinos podiam se contaminar com o fungo (DE BEURMANN et al., 1909).

O primeiro caso humano no Brasil foi no Rio de Janeiro, descrito por Terra e Rabelo em 1912 e durante os quatro anos seguintes, foram identificados casos nos estados do Acre, Rio

Grande do Sul, Minas Gerais, Bahia e Pernambuco (Donadel et al., 1993). A primeira ocorrência natural de esporotricose felina no Brasil foi relatada apenas em 1956 por Freitas et al. (1956).

Inicialmente, os maiores números de casos de esporotricose eram relatados nos EUA e na França, ocorrendo relatos também na Ásia e América do Sul. Durante a história da doença, foram descritos vários surtos, como nos EUA, Austrália e o maior de todos, na África do Sul (RIPPON, 1988; HELM; BERMAN, 1947). Atualmente há relato de casos em todos os continentes, sendo mais presente nas Américas, em países como Peru, México, Venezuela, Uruguai, Argentina e Brasil (MACHADO et al., 2019; HERNÁNDEZ-CASTRO, 2022).

Atualmente o Brasil enfrenta um surto de esporotricose, que se iniciou no estado do Rio de Janeiro na década de 1990 e se espalhou para os estados vizinhos, até alcançar estados da região Norte e Nordeste, com surtos relatados nos estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte (OROFINO-COSTA et al., 2017; RODRIGUES et al., 2020; RODRIGUES et al., 2022).

Desde a descoberta realizada por Schenck (SCHENCK, 1898) até o início do século XXI, o fungo *S. schenckii* foi considerado como um único microrganismo, sendo o agente causador da esporotricose. Em 1979, Kwon-Chung demonstrou que havia uma heterogeneidade, ao observar a morfologia e a virulência de várias cepas. Em 1985, Smith e Batenburg-Van Der Vegte também observaram uma heterogeneidade a partir de microscopia eletrônica, existindo padrões diferentes na membrana entre septos (KWON-CHUNG, 1979; SMITH; BATENBURG-VAN DER VEGTE, 1985). Foi apenas a partir de 2007, após diversos estudos moleculares combinados com estudos de taxonomia de fungos, que foi possível sugerir que *S. schenckii* era um complexo de espécies que estão relacionadas filogeneticamente, sugerindo 3 novas espécies (*S. mexicana*, *S. brasiliensis* e *S. globosa*) que, juntamente com *S. schenckii*, seriam parte do complexo e causariam a esporotricose (FLÓREZ-MUÑOZ; ALZATE; MESA-ARANGO, 2019; MARIMON et al., 2007).

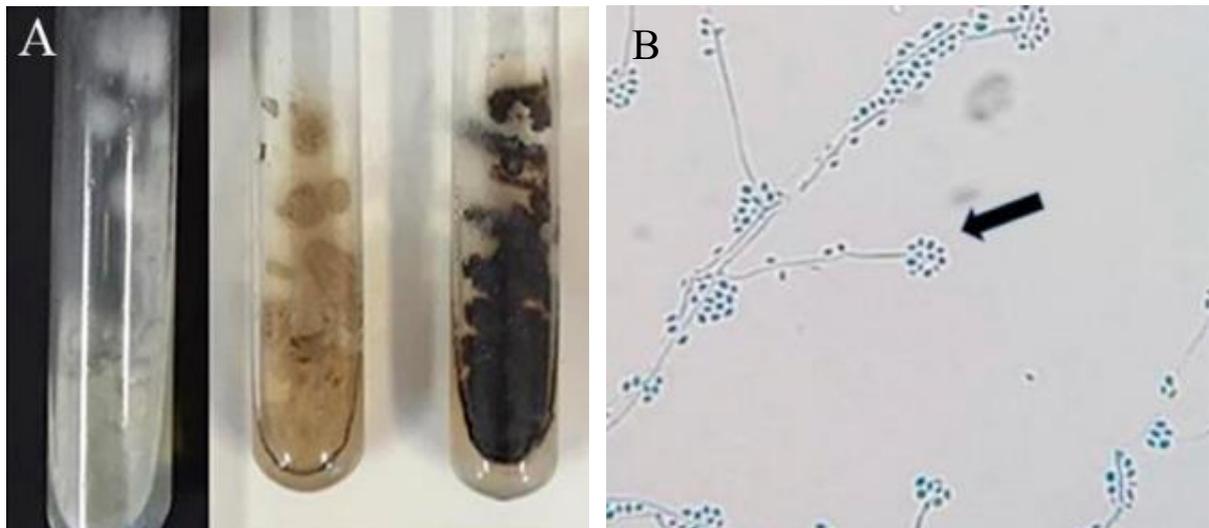
Atualmente a classificação por meio de um complexo está caindo em desuso, sendo atualmente sugerido o termo “clado clínico” ao se falar de espécies comumente relacionadas a casos de esporotricose, enquanto as demais espécies, encontradas no ambiente, estariam inclusas em um “clado ambiental”. Juntamente a essa nova terminologia, *S. mexicana* passou a integrar o “clado ambiental”, e o “clado clínico” é utilizado ao se referir a *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. schenckii* e *S. luriei* (RODRIGUES et al., 2022; KIDD; ABDOLRASOULI; HAGEN, 2023).

2.2 Morfologia

Os fungos do gênero *Sporothrix* são termodimórficos, se apresentando na forma filamentosa quando saprófita ou quando cultivado em laboratório, com temperaturas de 25 a 28°C; e na forma leveduriforme quando está no hospedeiro ou quando cultivado em laboratório na temperatura de 37 a 39°C (BAYRY, 2017).

A forma filamentosa tem a capacidade de crescer em uma diversidade de meios, incluindo os mais comumente utilizados em laboratório, como ágar batata dextrose (PDA), ágar Sabouraud e Mycosel. Quando cultivadas a temperatura de 25 a 28°C (Figura 1A), as colônias passam a ser visíveis geralmente a partir de 5 a 7 dias de cultivo, podendo em alguns casos, levar até 15 dias, e inicialmente se apresentam pequenas e cremosas ou brancas, mas que com um maior tempo de cultivo, podem passar a apresentar a coloração marrom, cinza-escuro ou até pretas (RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2013; OLIVEIRA, 2011).

Figura 1 – *Sporothrix* spp. na forma filamentosa.



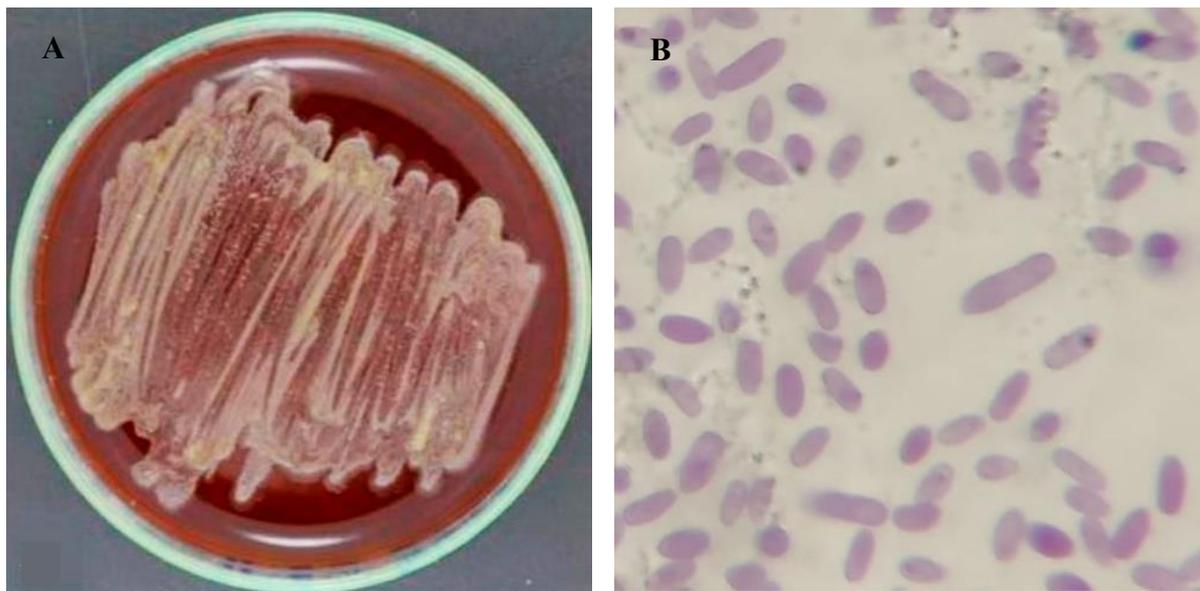
A: Macromorfologia de *Sporothrix* spp. cultivado em ágar batata a 28 °C. B. Micromorfologia de *Sporothrix* spp. apresentando hifas hialinas e conidióforos originando conídios em arranjo de “buquê de margarida”, exemplificado no círculo. Lâmina corada com azul de algodão, em aumento de 400x. Fonte: CEMM.

Ao se observar microscopicamente (Figura 1B), apresenta hifas hialinas septadas, com 1-2 μm de largura, podendo apresentar dois tipos de conídios: os conídios primários e os conídios secundários. Os conídios primários, ou também chamados de conídios simpodiais, são conídios hialinos de paredes finas, comumente ovais e elípticos, se apresentando em um arranjo

semelhante a um buquê de margaridas nas extremidades do conidióforo. Já os conídios secundários, ou também chamados de conídios sésseis, são conídios castanhos de paredes espessas que emergem de hifas indiferenciadas, podendo se apresentar de diversas formas, como piriforme, ovoide e esférica (OLIVEIRA, 2011; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2013; RODRIGUES et al., 2020).

Já a forma leveduriforme geralmente estão visíveis com 5 dias de incubação, podendo haver casos com 15-20 dias para crescimento (Figura 2A). A forma leveduriforme apresenta colônias na coloração cremosa a amarelo-acinzentada, com um aspecto macio. Para se obter a forma leveduriforme, no entanto, é necessário um cultivo em meio enriquecido, como ágar BHI (Brain Heart Infusion) ou ágar sangue na temperatura de 37°C. Além disso outros fatores estimulam o processo de reversão, como pH em 7,2, níveis de glicose e pressão de CO₂ em 5%.

Figura 2 – *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme.



A: Crescimento macroscópico de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme a 37 °C, cultivado em ágar BHI suplementado com 5% de sangue de carneiro, apresentando colônia de superfície irregular da cor creme. B: Aspecto microscópico de leveduras de *Sporothrix* spp., com células esféricas ou ovais, algumas com brotamentos. Lâmina corada com azul de algodão, em aumento de 1000x. Fonte: CEMM.

Com a reversão já feita, é possível manter a forma leveduriforme nos meios enriquecidos ou ágar Sabouraud, na temperatura de 37°C. Ao se observar microscopicamente (Figura 2B), as colônias são compostas por células redondas ou ovais, com brotamento único ou múltiplos. (RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2018; BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011).

2.3 Fatores de virulência

Um fator de virulência é definido como um elemento do patógeno que contribui para danificar o hospedeiro, cuja ausência causa redução da virulência do fungo sem afetar o crescimento ou a aptidão do organismo (REMENTERIA et al., 2005). A expressão desses fatores permite ao microrganismo uma maior chance de se manter no seu habitat natural ou no hospedeiro, durante uma infecção. Por isso, é possível dizer que são estratégias de sobrevivência (TAMEZ-CASTRELLÓN, 2020).

Com relação a *Sporothrix* spp., podemos citar alguns fatores de virulência já demonstrados, como a produção de melanina, que protege o fungo contra estresses ambientais e do hospedeiro; formação de biofilmes, uma estrutura que participa da resistência aos antifúngicos; superexpressão de bombas de efluxo, vesículas extracelulares, que transportam elementos necessários para a virulência fora da célula; lipídios, encontrados na parede celular; quinases e proteínas de choque térmico, que participam da termotolerância e do dimorfismo; e proteinases extracelulares e intracelulares, que auxiliam o fungo a colonizar os tecidos do hospedeiro; Dentre esses, a formação de biofilmes e a produção de melanina estão entre os principais fatores (BRILHANTE et al., 2018a; TAMEZ-CASTRELLÓN, 2020; WALLER et al., 2021; GARCÍA-CARNERO et al., 2022).

2.3.1 Melaninas

As melaninas são uma classe de pigmentos que variam de castanho até preto, e que são gerados pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e, embora esses pigmentos não sejam essenciais para o crescimento do fungo, eles desempenham um papel fundamental na sobrevivência do organismo. Além disso, podem conferir estabilidade contra certos estresses ambientais, como proteger o fungo de radiação UV, lise química e física e impedem que os compostos antifúngicos atinjam seus alvos dentro das células fúngicas (ALMEIDA-PAES et al., 2012). Além disso, em várias espécies fúngicas patogênicas, os pigmentos de melanina protegem os fungos das respostas imunes inatas do hospedeiro mamífero, inibindo a fagocitose e a morte de células fúngicas pelas células hospedeiras (SMITH; CASADEVALL, 2019).

Para a produção de melanina em fungos, as principais rotas são as da DOPA e DHN. No entanto, além de *Sporothrix* spp. utilizar ambas as rotas, utiliza uma terceira via chamada de piomelanina. A primeira via necessita da presença de substratos exógenos, como a 3,4-diidroxifenilalanina, e a melanina produzida é denominada de eumelanina, enquanto a segunda

via utiliza precursores produzidos via acetil-CoA a partir da glicólise. Já a terceira via, chamada de piomelanina, usa precursores de L-tirosina na síntese (MORRIS-JONES et al., 2003; ALMEIDA-PAES et al., 2016; ALMEIDA-PAES et al., 2017; GARCÍA-CARNERO et al., 2022).

A melanina confere grandes vantagens aos organismos, como seu papel como fator de virulência. Um exemplo disso são que células não melanizadas de *Sporothrix* spp. são mais suscetíveis a serem engolfadas por monócitos humanos (ALMEIDA-PAES et al., 2015). Além disso, a melanina confere uma maior proteção a células fúngicas contra espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), que são compostos químicos liberados pelas células hospedeiras como mecanismo de defesa. O pigmento também já foi proposto como o principal mecanismo que protege o fungo contra a radiação UV (ROMERO-MARTINEZ et al., 2000; GARCÍA-CARNERO et al., 2022), e outros estudos mostram que cepas de *Sporothrix* spp. sem melanina causam menos progressão da esporotricose (MADRID et al., 2010). Devido a esses e diversos outros fatores, foi proposto que a presença de melanina em *Sporothrix* spp. pode ser um fator importante no desenvolvimento da micose (MADRID et al., 2010; GARCÍA-CARNERO et al., 2022).

Nos fungos patogênicos humanos *H. capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* e *P. brasiliensis*, a melanina fornece resistência a anfotericina B (TABORDA et al., 2008). Além disso, células melanizadas de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* têm resistência aos antifúngicos terbinafina e anfotericina B, que são opções para o tratamento da esporotricose em casos de impossibilidade da utilização de itraconazol ou em casos graves, respectivamente (ALMEIDA-PAES et al., 2016; GARCÍA-CARNERO et al., 2022).

Como um fator de resistência antifúngica, a melanina e suas vias de síntese podem passar a ser um alvo para o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos para terapias de esporotricose. Um estudo mostrou que a melanina é um fator chave para prevenir a fagocitose de *S. globosa* por macrófagos, além disso, a melanina presente em *S. globosa* podem diminuir a expressão de receptores envolvidos no reconhecimento do fungo. Com isso, a presença de melanina na parede celular do patógeno reduz a possibilidade de o hospedeiro combater o fungo, culminando também com uma diminuição da resposta pró-inflamatória (NEGRINI et al., 2014; GUAN et al., 2021).

2.3.2 Formação de biofilmes

Os biofilmes podem ser definidos como uma comunidade microrganismos, que ficam em uma matriz de polímeros orgânicos, aderidos a uma superfície. Esses biofilmes se formam a partir da deposição e adesão de microrganismos em uma superfície, formando assim uma matriz de exopolissacarídeos (EPs) (XIROS; STUDER, 2017; GARCÍA-CARNERO et al., 2022).

A formação de biofilme tem sido considerada um fator de virulência em diferentes fungos patogênicos humanos, como *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Cryptococcus* spp. *Sporothrix* spp. é capaz de gerar essa estrutura complexa, em que seus principais componentes são glicoproteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídios. Essa estrutura dificulta o tratamento, já que além de ser uma barreira que impede o acesso de certas moléculas ao interior do biofilme, é um participante chave na aquisição de resistência aos antifúngicos de escolha para o tratamento. O pouco acesso que os antifúngicos acabam tendo para atingir as células-alvo por impedimento, adsorção, inativação, neutralização ou expulsão causada pelo biofilme, fazendo com que o desenvolvimento do biofilme seja um fator importante para o desenvolvimento e persistência de esporotricose (BRILHANTE et al., 2018a; BRILHANTE et al., 2019; SÁNCHEZ-HERRERA et al., 2021; GARCÍA-CARNERO et al., 2022).

A formação de biofilmes em *Sporothrix* foi descrita pela primeira vez em 2014 por Sánchez Herrera et al. (2014), demonstrado sua capacidade de formação de biofilme e características relacionadas. Posteriormente, outros estudos foram capazes de observar características mais específicas com relação ao biofilme de *Sporothrix* spp., como seu tempo ótimo de formação. Além disso, foram observados também que os biofilmes filamentosos são robustos, contendo uma grande quantidade de hifas e conídios, além de se mostrarem até 50 vezes mais resistentes às drogas testadas quando comparados a células planctônicas. Já os biofilmes leveduriformes apresentaram níveis de resistência semelhantes aos encontrados nos biofilmes filamentosos, mas observou-se diferenças na composição da parede celular das células leveduriformes e filamentosas que podem acabar afetando a susceptibilidade a drogas, como a quantidade de melanina (BRILHANTE et al., 2018a; 2019a).

2.4 Epidemiologia

A esporotricose é uma micose cosmopolita, com alguns agentes etiológicos específicos de determinadas regiões, enquanto outros estão distribuídos ao longo dos continentes (Figura

3). As espécies do clado clínico não se distribuem igualmente pelo mundo e também estão associadas a diferentes rotas de transmissão. A esporotricose é uma doença considerada epidemiologicamente misteriosa, visto que não existe uma estatística oficial, mas apenas uma série de casos e surtos mostram o problema (RODRIGUES et al., 2022).

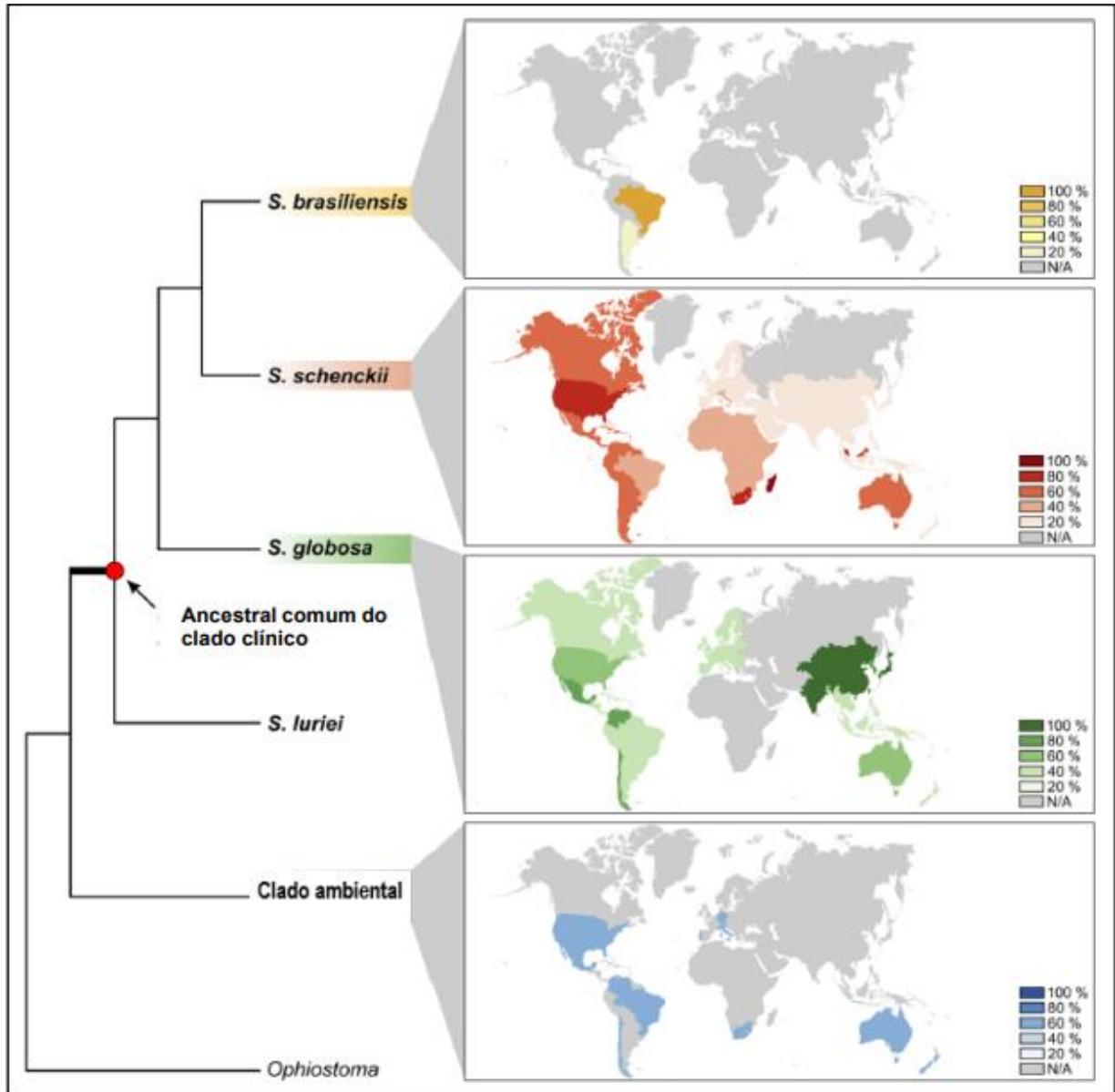
Observando geograficamente os agentes da esporotricose (Figura 2), é possível notar sua distribuição desigual. *S. globosa* é mais predominante na Ásia; *S. schenckii* tem uma alta prevalência na Austrália, África, Oeste da América do Sul, América Central e América do Norte; e *S. brasiliensis* é mais prevalente no Brasil (RODRIGUES et al., 2020; RODRIGUES et al., 2022).

A história da esporotricose se dá a partir de repetidos surtos e epidemias, em que o mais famoso ocorreu por volta da década de 1940 na África do Sul, com mais de 3000 pessoas contaminadas (BROWN et al., 1947). No continente africano, a esporotricose animal é rara e a transmissão sapronótica é a mais comum, com *S. schenckii* como o principal agente causador. No entanto, há uma escassez de dados sobre casos de esporotricose no continente, ocorrendo relatos principalmente em Madagascar, Zimbábue, Nigéria e Sudão (GOVENDER et al., 2015; RODRIGUES et al., 2022).

Já no que diz respeito ao continente asiático, os dados epidemiológicos advêm principalmente da China, Índia, Japão e Malásia, com a China possuindo uma das maiores taxas de esporotricose do continente e com esporotricose humana endêmica, assim como a Índia. Da mesma forma que no continente africano, na Ásia a esporotricose é uma sapronose, com a inoculação traumática por material vegetal como principal via de transmissão. No entanto, o principal agente etiológico é *S. globosa*. A Malásia difere um pouco dos outros países nesse caso, com *S. schenckii* sendo responsável por algumas epizootias e, conseqüentemente, mais casos zoonóticos (KANO et al., 2015; RUDRAMURTHY et al., 2021).

A esporotricose foi extremamente comum na Europa no início do século XX, com diversos relatos principalmente na França. Contudo, ao longo do tempo os casos da doença diminuíram drasticamente, com poucos casos principalmente no Reino Unido, Itália e Espanha (MADRID et al., 2009; RODRIGUES et al., 2022).

Figura 3: Epidemiologia de *Sporothrix* spp.



Distribuição global de *Sporothrix* spp., destacando as 3 espécies mais comuns do clado clínico. A legenda aponta a frequência de cada espécie em um país ou região, baseando-se nos dados presentes na literatura. Fonte: Traduzido de Rodrigues et al. (2020).

Na Oceania, apenas alguns poucos casos foram relatados na Austrália, com *S. schenckii* e *S. globosa* seguindo uma rota sapronótica e com casos raros de esporotricose felina (SCHAUER et al., 2020).

Já nas Américas, pode-se dizer que a esporotricose é relativamente comum, com a maioria dos casos nos EUA estarem relacionados com condições oportunistas, relacionadas principalmente a HIV/aids (GOLD et al., 2016). Já na América Latina, a esporotricose é a micose de implantação mais comum, principalmente no Brasil, Colômbia, Peru e Venezuela. A

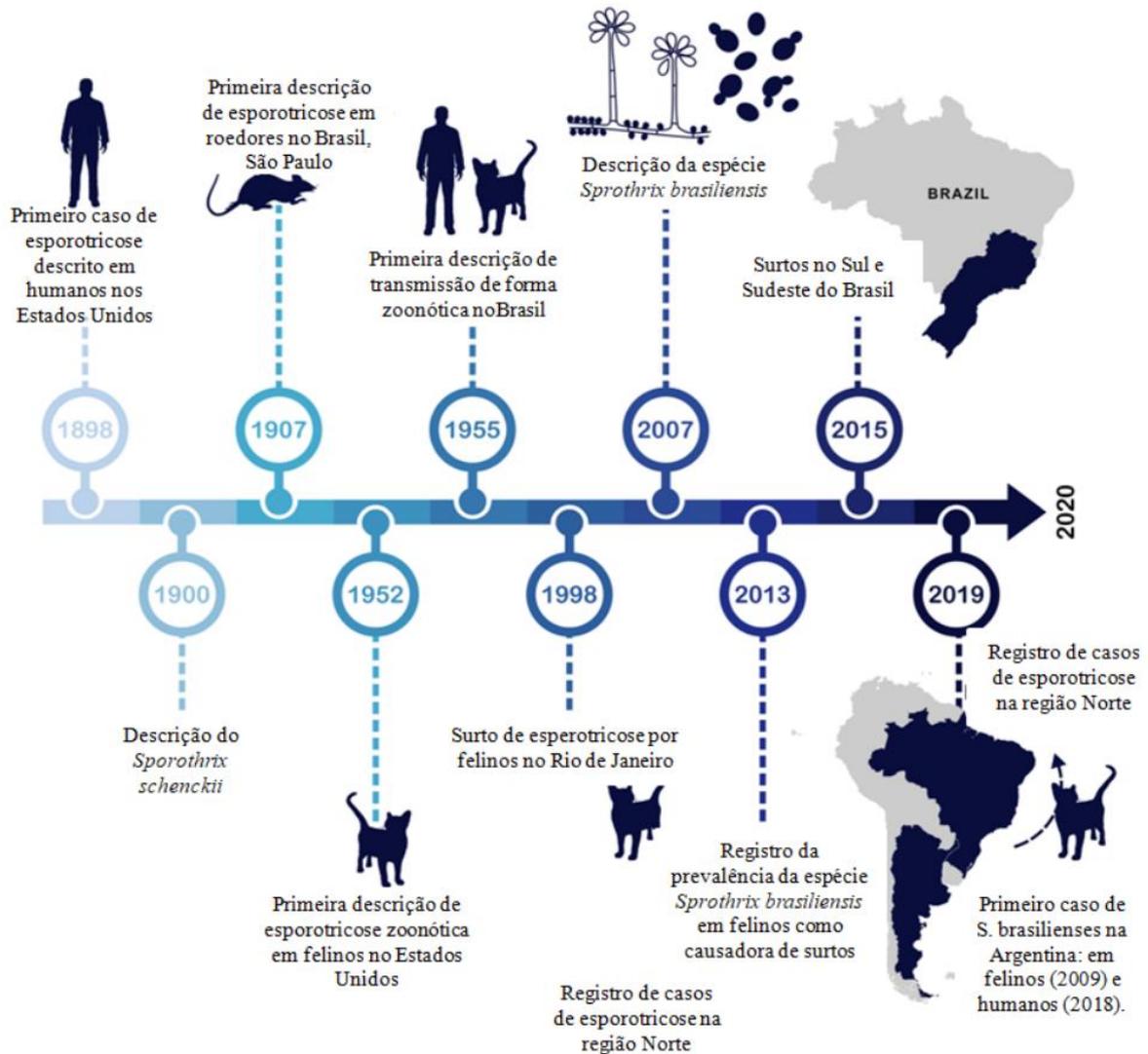
rota sapronótica é a mais comum na Colômbia, Peru e Venezuela, em que os principais agentes são *S. schenckii* e *S. globosa* (HERNÁNDEZ-CASTRO et al., 2022). Já no Brasil, a via zoonótica é a de mais ocorrência, com a esporotricose felina como o principal meio de infecção para humanos e outros felinos, sendo o *S. brasiliensis* o principal agente nesses casos (GREMIÃO et al., 2017).

No Brasil, até a década de 1990, a forma de transmissão mais comum era a sapronótica, de forma semelhante aos outros países da América Latina. No entanto, a partir dessa década, os gatos domésticos passaram a ser a principal forma de transmissão da esporotricose, ao se observar um aumento de epizootias e, conseqüentemente, de transmissões zoonóticas. Esses casos possuem como epicentro o estado do Rio de Janeiro, com um surto de esporotricose felina em 1998. Em 2013 observou-se a prevalência de *S. brasiliensis* em felinos e relacionando-a com os surtos. A doença se espalhou inicialmente para os estados vizinhos, apresentando em 2015 surtos na região sul e sudeste do Brasil (RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2016). Mais recentemente, os casos alcançaram os estados da região Norte e Nordeste em 2019, com emergência em Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte (RODRIGUES et al., 2020; RODRIGUES et al., 2022).

Em 2022 houve o primeiro caso de esporotricose felina diagnosticado no estado do Ceará, contudo acredita-se que a doença foi adquirida em Recife-Pernambuco, visto que o animal esteve na cidade cerca de 90 dias antes do aparecimento das lesões (AGUIAR et al., 2023). Além disso, há uma relação direta de surgimento de casos felinos seguido de surgimento de casos humanos, a partir de transmissões zoonóticas, o que sugere a possibilidade de surgimento de casos de esporotricose humana no Ceará (RODRIGUES et al., 2022).

A figura 4 mostra uma representação cronológica de importantes acontecimentos da história e da epidemiologia da esporotricose.

Figura 4: Cronologia de importantes eventos históricos e epidemiológicos da esporotricose.



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

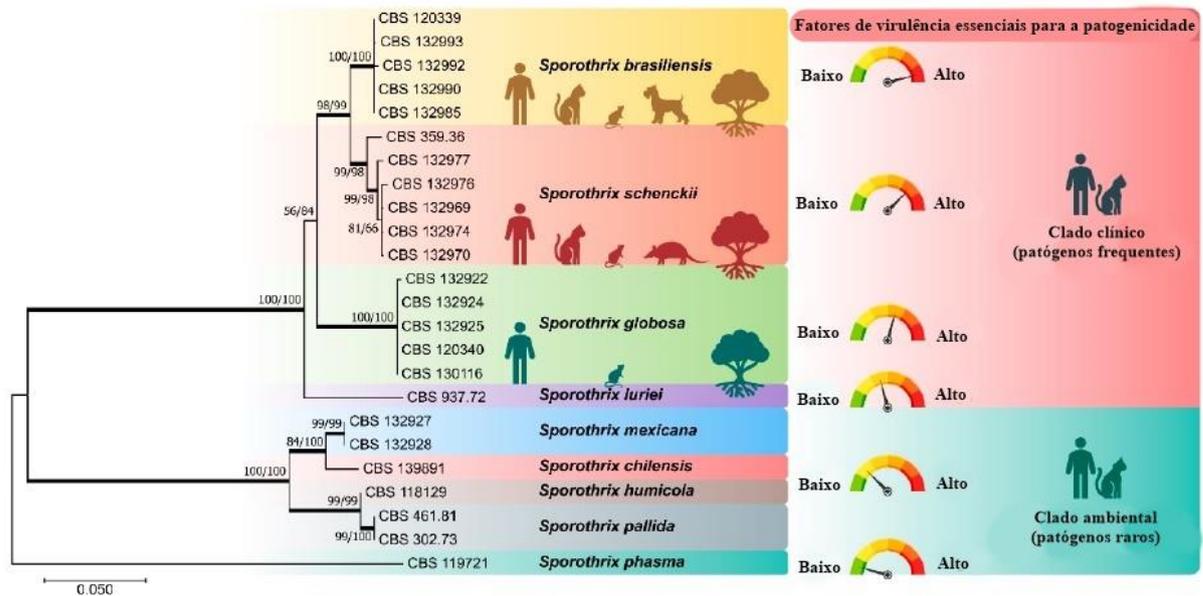
2.5 Esporotricose

2.5.1 Patogenia

O gênero *Sporothrix* é bastante diverso, sendo composto por 53 espécies descritas, formado principalmente por fungos que estão associados a besouros e plantas. Apesar do número razoável de espécies no gênero, apenas nove são patogênicas para mamíferos, como camundongos, cavalos e chimpanzés, além dos mais comuns, que são humanos, gatos e cães. As 4 espécies que mais comumente causam a esporotricose (*S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. schenckii* e *S. luriei*) se apresentam em um clado clínico (Figura 5), enquanto as outras espécies do gênero ficam classificadas em um clado ambiental (RODRIGUES, 2022). O gênero faz parte

do Reino Fungi, filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Ophiostomatales e família Ophiostomataceae.

Figura 5: Listagem de espécies causadoras da esporotricose e sua patogenicidade.

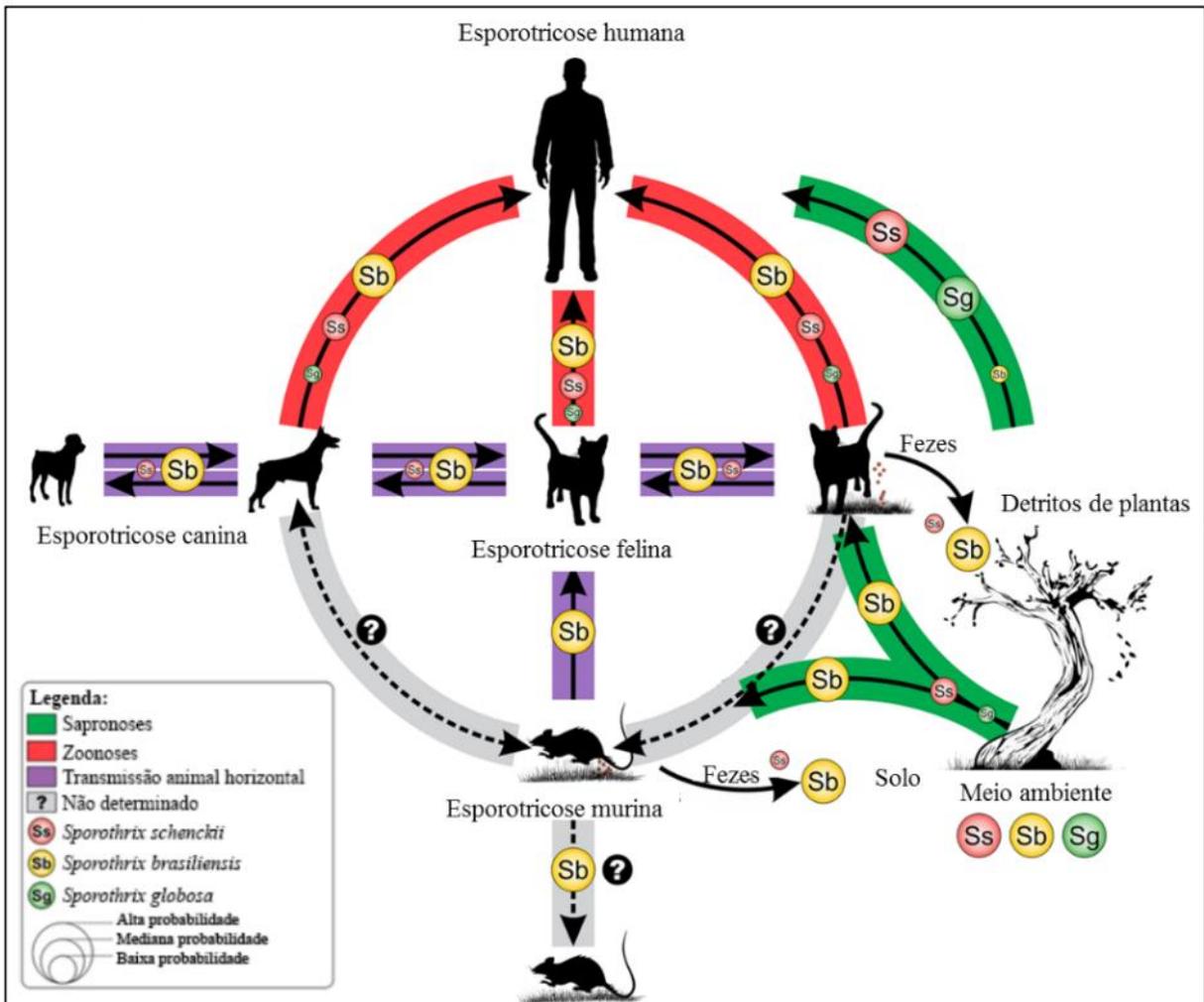


Apresentação de espécies causadoras da esporotricose, listando as espécies que comumente estão relacionadas a doença, que são as pertencentes ao clado clínico; e as que, em casos raros podem causar a doença, pertencentes ao clado ambiental. Fonte: Traduzido de Rodrigues et al. (2022)

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por espécies do clado clínico de *Sporothrix* spp., que são encontradas em todo o planeta, em vegetações, matérias orgânicas em decomposição, musgos e solo. A doença se inicia através da inoculação traumática de propágulos fúngicos no tecido subcutâneo. Essa inoculação pode estar relacionada a trabalhadores em que a ocupação seria em locais onde o fungo se fazia presente; ou a partir de ferimentos por animais contaminados (OROFINOCOSTA et al., 2017; RODRIGUES et al., 2020).

A esporotricose possui duas principais vias de transmissão para o homem. Classicamente, a mais comum é a sapronótica, que necessita de contato direto com solo e matéria orgânica em decomposição, e está amplamente relacionada a certas profissões, como jardineiros, agricultores, floristas, extrativistas e fazendeiros. Já a rota alternativa envolve a transmissão horizontal entre animais, como cães, murinos e principalmente felinos; e a transmissão zoonótica, que se relaciona diretamente com o contato de humanos com animais domésticos e de rua. A figura 6 apresenta esquematicamente as rotas de transmissão da esporotricose (GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2022).

Figura 6: Esquema representativo das rotas de transmissão da esporotricose.



Fonte: traduzido de Rodrigues; De Hoog; De Camargo (2016).

Os hospedeiros mais susceptíveis a contaminação por *Sporothrix* spp. são os gatos, particularmente devido aos seus costumes de afiar as unhas em troncos de árvores e enterrar fezes no solo, e o mais comum é que desenvolvam formas mais graves da doença, com possibilidade de morte. As lesões são ulcerativas e múltiplas, geralmente estão presentes no focinho, cabeça ou patas, visto que biofilmes de *Sporothrix* spp. crescem em unhas de gatos (BRILHANTE et al., 2021) e é do comportamento felino atos de arranhar e morder. A esporotricose felina é mais frequente em machos adultos não castrados, por estarem mais propensos a conflitos e ferimentos (RODRIGUES et al., 2022).

A esporotricose humana é uma infecção que apresenta suas manifestações clínicas diretamente relacionadas ao comportamento dos infectados, ligadas a forma e região de contato, sendo face, membros superiores e inferiores os mais comuns. Inicialmente, a lesão tem aspecto papulonodular onde o fungo foi introduzido na pele, podendo surgir entre duas a quatro semanas

após o trauma. As lesões, que geralmente são nódulos, podem ulcerar, progredindo ao longo dos canais linfáticos ascendentes ou descendentes após algumas semanas. (RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2015; OROFINO-COSTA et al., 2017; RODRIGUES et al., 2020).

2.5.2 Apresentações clínicas

As manifestações clínicas da esporotricose são divididas principalmente em cutâneas e extracutâneas, sendo a cutânea a forma mais comum, com mais de 95% dos casos. A forma cutânea ainda pode ser dividida em linfocutânea, cutânea fixa e cutânea disseminada. Já a forma extracutânea, considerada rara, ocorre quando é observada em qualquer órgão ou tecido que não a pele (LOPES-BEZERRA et al., 2006; OROFINO-COSTA et al., 2017).

A forma linfocutânea (Figura 7) é a forma mais comum entre os pacientes acometidos pela esporotricose, que podem variar de 70-90% dos casos. Se caracteriza por pequenos nódulos que seguem o trajeto do sistema linfático, ascendente ou descendente, da região do trauma, que é precedida por um caso bem definido de inoculação ou trauma cutâneo (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006; OROFINO-COSTA et al., 2017; RODRIGUES et al., 2020)

Figura 7. Forma linfocutânea da esporotricose.



Legenda: Lesão nodular ulcerativa no polegar, seguida de lesões nodulares e/ou ulcerativas nos linfáticos regionais. Fonte: Rodrigues et al. (2020).

Já a forma cutânea fixa (Figura 8) é caracterizada pela presença de apenas uma única lesão localizada, no local em que ocorreu a inoculação, geralmente semelhante ao cancro de inoculação, como lesão ulcerada, verrucosa ou papular, sem disseminação linfática (BARROS et al., 2008; OROFINO-COSTA et al., 2017).

Figura 8. Forma cutânea fixa da esporotricose.



Legenda: Lesão nodular ulcerativa no dorso da mão. Fonte: Orofino-costa et al. (2017).

Em menor grau, pode ocorrer a forma cutânea disseminada (Figura 9), que geralmente estão relacionadas com pacientes com algum déficit do sistema imunológico como idade avançada, alcoolismo, diabetes, corticoterapia prolongada ou drogas imunossupressoras, AIDS, nefropatias, entre outros. Nesses casos é possível observar lesões cutâneas ao longo de todo o corpo do indivíduo, que com o passar de dias ou semanas podem ulcerar (SIDRIM; ROCHA, 2004; WHITE et al., 2019).

Figura 9: Forma cutânea disseminada da esporotricose.



Legenda: Forma sistêmica com lesões cutâneas disseminadas. Fonte: Orofino-Costa et al. (2017)

A extracutânea é a forma mais rara da esporotricose e ocorre quando se observa a doença em qualquer órgão ou tecido, em decorrência da disseminação hematogênica ou por meio de ingestão ou inalação do fungo. As formas extracutâneas mais comuns são a ocular, pulmonar e osteoarticular, sendo a pulmonar a mais comum, com cerca de 100 casos relatados. Os casos

geralmente estão relacionados a pacientes imunossuprimidos, e são de difícil diagnóstico e tratamento (BONIFAZ et al., 2017; OROFINO-COSTA et al., 2017; GREMIÃO et al., 2020).

2.5.3 Diagnóstico laboratorial

A esporotricose pode ser diagnosticada considerando diversos fatores e informações de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Um diagnóstico laboratorial feito de forma precoce e preciso da esporotricose é extremamente importante, pois o aspecto clínico das lesões cutâneas pode acabar mimetizando doenças como micobacteriose, leishmaniose tegumentar americana, blastomicose, paracoccidiodomicose e criptococose (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011; OROFINO-COSTA et al., 2017).

O diagnóstico da esporotricose pode se basear em diversos tipos de exames, como no isolamento e identificação do *Sporothrix* em cultura, citopatologia, histopatologia, teste cutâneo, sorologia, imuno-histoquímica e técnicas moleculares. Em suspeita de formas sistêmica, também devem ser solicitados exames laboratoriais complementares como hemograma e perfil bioquímico (RODRIGUES et al., 2022).

Dependendo da forma clínica e das abordagens laboratoriais, vários tipos de amostras biológicas podem ser coletadas e investigadas. Os mais comuns são fragmentos de tecidos, exsudatos serossanguinolentos, secreção purulenta, raspagem de crostas hiperqueratóticas e aspirado de linfonodos. Alguns cuidados devem ser seguidos para não afetar a qualidade da amostra, como temperatura para o transporte do material, tempo de armazenamento e o processamento adequado da amostra. O material deve ser semeado o mais rápido possível em meios de cultura, no entanto, em possíveis eventualidades, a amostra clínica deve ser mantida a 4°C por um tempo inferior a 8–10 h (SCHWARZ, 1982; GEZUELE; DA ROSA, 2005; GREMIÃO et al., 2020).

O método considerado padrão ouro para o diagnóstico da esporotricose é a cultura, feita a partir do isolamento e identificação do microrganismo em meios de cultura, com a caracterização do agente feita por parâmetros morfológicos. O método possui diversas vantagens, por ser considerado de baixo custo, confiável e amplamente utilizado na rotina clínica (RODRIGUES; OROFINO-COSTA; DE CAMARGO, 2019; GREMIÃO et al., 2020; RODRIGUES et al., 2022). A cultura ocorre a partir da semeadura do material coletado em meios de cultura padrão para análises micológicas, sendo eles o ágar Sabouraud simples, ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol ou o ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida. O tempo médio de crescimento do *Sporothrix* spp. na forma filamentosa, numa

temperatura de 25°C, é de 3 dias a 2 semanas. Os isolados podem ser identificados a partir de características macro e micromorfológicas (RODRIGUES et al., 2022; RODRIGUES; HAGEN; DE CAMARGO, 2022; DA CRUZ BAHIENSE ROCHA et al., 2021).

O exame micológico direto também pode ser utilizado, contudo, o material biológico obtido de lesões de pele humana e fragmentos de tecido tem baixa carga fúngica, o que acaba dificultando a visualização. Mesmo em exames diretos com amostras tratadas com solução de hidróxido de potássio (KOH) 10-30% ou com técnicas de coloração rápida, raramente é possível observar o fungo no exame. No entanto, o exame direto possui uma maior positividade em casos de pacientes imunossuprimidos, além de alguns estudos sugerirem que *imprint* de secreção purulenta ou biópsias coradas com Giemsa aumentam a sensibilidade do teste em humanos (WARNOCK, 2012; OROFINO-COSTA et al., 2017; RICHARDSON; ARENAS et al., 2018).

O exame citopatológico, que pode ser corado com ácido periódico de Schiff (PAS) ou com metenamina de prata de Grocott-Gomori (GMS), o que permite em alguns poucos casos (cerca de 20%) a observação de granuloma de células epitelóides, corpos asteróides e leveduras, principalmente em casos de esporotricose extracutânea ou disseminada. Por outro lado, diferentes técnicas de coloração citopatológica são mais sensíveis em animais, particularmente felinos. O exame citopatológico de exsudatos e lesões de pele mostra alta carga fúngica, permitindo observar células leveduriformes de *Sporothrix* que variam de arredondadas, ovais ou em forma de charuto, circundadas por um halo transparente em forma de cápsula (MAHAJAN, 2014; RODRIGUES et al., 2022; REDIGUIERI et al., 2022).

De forma semelhante ao citopatológico, os achados histopatológicos em amostras humanas podem ser inespecíficos, apenas indicando o diagnóstico de esporotricose humana, também devido a escassez de estruturas fúngicas. O padrão histopatológico observado são reações granulomatosas, podendo se apresentar com hiperplasia epidérmica (com ou sem ulceração), acantose papilomatosa, hiperqueratose, microabscesso intraepidérmico e elementos fúngicos, como células de levedura e corpos asteroides. Em aproximadamente 50% dos casos, as leveduras podem ser visíveis em esfregaços de tecido corados. Em pacientes com AIDS, os achados histopatológicos são incomuns, devido a resposta inflamatória menor (ZHANG et al., 2012; RODRIGUES et al., 2022).

Os primeiros trabalhos para o desenvolvimento de testes sorológicos para a esporotricose já surgiram em 1910, e ao longo dos anos diversos testes surgiram, e muitas tentativas foram feitas para que se passasse a adotá-los para o diagnóstico da esporotricose, já que são rápidos, precisos e não invasivos. No entanto, a ausência de um antígeno padrão e

comercial dificultam a padronização e utilização de um teste sorológico para a doença (WIDAL et al., 1910).

Estudos mais recentes mostram testes ELISA que demonstraram uma alta especificidade (82%) e uma alta sensibilidade (89%), com uma reprodutibilidade de 98%, mostrando que os métodos sorológicos podem avaliar qualitativa e quantitativamente a condição, podendo gerar resultados rápidos e com altos níveis de especificidade e sensibilidade (WIDAL et al., 1910; BERNARDES-ENGEMANN et al., 2015; RODRIGUES et al., 2022).

Até os dias de hoje, os diagnósticos acerca da esporotricose não fazem a identificação a nível de espécie. Além disso, apesar dos métodos clássicos terem um custo reduzido, são trabalhosos, demorados e não permitem a identificação a nível de espécie. Dito isso, os avanços na biologia molecular apresenta resultados promissores. A reação em cadeia da polimerase (PCR) já são utilizadas para a identificação da esporotricose, com técnicas que utilizam crescimento de culturas e técnicas não dependentes de cultura, apresentando 100% de especificidade e 98% de sensibilidade. No entanto, além de poucas técnicas conseguirem chegar na identificação até o nível de espécie, não são amplamente disponíveis nos serviços de saúde, e acabam ficando restritas a grandes centros de pesquisa e laboratórios, o que afeta negativamente o diagnóstico da doença (DE CARVALHO et al., 2022; DELLA TERRA et al., 2022).

Outra técnica que passou a ser mais utilizadas nas duas últimas décadas é a de MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Light), e tem sido uma poderosa ferramenta na identificação de microorganismos. O Maldi-Tof é uma técnica que usa ionização para diagnosticar as proteínas e, a partir das informações obtidas, indentificar o microorganismo a partir da comparação dos dados obtidos com dados já presentes em sua biblioteca. Nos últimos anos a técnica passou a ter presente em seus bancos de dados informações que permitem identificar também fungos filamentosos, e de forma bastante precisa. No que diz respeito a *Sporothrix* spp., o método já possui informações em seus bancos de dado que permitem o reconhecimento de *S. brasiliensis*, *S. Globosa*, *S. Schenckii* e *S. luriei*, além de alguns membros que fazem parte do clado ambiental. Apesar de a técnica ser considerada confiável e rápida existem algumas desvantagens, como a necessidade de uma cultura prévia e de um banco de dados robusto e com as informações já presentes (OLIVEIRA et al., 2015; SINGHAL et al., 2015; MF MATOS et al, 2019; RODRIGUES et al., 2022).

2.5.4 Tratamento

A escolha do tratamento da esporotricose depende de alguns fatores, como a forma clínica da doença, o estado imunológico do hospedeiro e da espécie de *Sporothrix* spp. envolvida. As espécies mais virulentas (*S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa*) apresentam diferentes perfis de sensibilidade aos antifúngicos, o que torna a resposta à terapia variável. Dentre as opções de escolha para o tratamento, podemos citar o iodeto de potássio, itraconazol, terbinafina e anfotericina B (ESPINEL-INGROFF, 2017).

A solução de iodeto de potássio foi o primeiro tratamento para a esporotricose e é utilizado desde 1903, período em que ainda não se existia drogas antifúngicas disponíveis. A solução também é utilizada para várias outras doenças infecciosas e não infecciosas, por possuir atividade imunomoduladora. Apesar de sua eficácia, seu mecanismo de ação no combate a microrganismo ainda não é claro. Existem algumas desvantagens na sua utilização, como gosto metálico e náuseas e, para o tratamento em humanos seu uso já foi substituído pelo itraconazol. Contudo, ainda é utilizado em formas cutâneas humanas e felinas, devido ao seu baixo custo (GREMIÃO et al., 2022; SHARMA et al., 2022).

Atualmente o itraconazol é a droga de escolha nos casos mais comuns de esporotricose, devido a sua eficácia, segurança e conveniência para a esporotricose cutânea e linfocutânea, sendo utilizado também para o tratamento de animais no Brasil. O itraconazol é uma droga fungistática que inibe a síntese de ergosterol, o principal esterol da membrana celular do fungo. Embora seja eficaz, sua utilização possui efeitos colaterais e pode interagir com mais de 200 outros medicamentos, podendo gerar efeitos adversos ou ineficácia. Os principais efeitos colaterais são dores de cabeça e distúrbios gastrointestinais, além de não poder ser utilizado por pacientes com doenças hepáticas ou por gestantes (BORBA-SANTOS et al., 2014; RODRIGUES; FERNANDES; DE CAMARGO, 2017; SHARMA et al., 2022).

Outro inibidor da síntese do ergosterol que é utilizado para o tratamento da esporotricose é a terbinafina, sendo utilizada para a forma cutânea em humanos quando o itraconazol não pode ser utilizado. Por ser um derivado alilanina, seu mecanismo de ação está ligado ao bloqueio da síntese do ergosterol, inibindo assim a enzima esqualeno epoxidase. A terbinafina é uma boa alternativa para casos em que não se pode utilizar o itraconazol, no entanto, seu alto custo dificulta sua utilização e aquisição por parte da população (FRANCESCONI et al., 2011; SHARMA et al., 2022).

Para casos mais graves, onde há risco de vida, o antifúngico de escolha é a anfotericina B. Nesses casos, é utilizada até que haja melhora clínica suficiente para que seja substituída

pelo itraconazol. A anfotericina B age se ligando aos esteróis da membrana celular do fungo, criando uma alteração na permeabilidade da membrana, provocando extravasamento dos componentes intracelulares. Embora seja muito eficaz, sua utilização não é recomendada em casos mais simples devido a sua toxicidade, além da necessidade de ser administrado por via intravenosa (OROFINO-COSTA et al., 2017; CAROLUS et al., 2020).

Apesar de na grande maioria dos casos as drogas antifúngicas já apresentadas sejam o suficiente para a cura da esporotricose, já existem relatos de falhas terapêuticas, recaídas após melhora inicial e a não resposta ao tratamento. Devido a esse fato, torna-se necessário para o combate a esporotricose a busca por novos compostos que tenham potencial antifúngico para inibir o crescimento de *Sporothrix* spp. ou que possam atuar de forma combinada com os antifúngicos já utilizados (RODRIGUES et al., 2022).

2.6 A busca por novas estratégias terapêuticas e o redirecionamento de fármacos

Nos últimos anos o número de falhas terapêuticas no tratamento da esporotricose aumentaram, já havendo relatos de resistência a itraconazol, terbinafina e anfotericina B. Levantamentos de estudos mostram que cepas de *S. schenckii* de todo o mundo, com exceção de cepas da Argentina, apresentaram resistência a itraconazol e anfotericina B. Já em estudos feitos com *S. brasiliensis*, foi observado resistência a itraconazol e terbinafina. Essa diminuição da eficácia dos antifúngicos pode estar relacionada ao desenvolvimento de mecanismos de resistência, o que reduz sua atividade antifúngica. Os principais mecanismos de resistência de *Sporothrix* spp. são a produção de melanina, formação de biofilme, superexpressão de bombas de efluxo e mutação da enzima alvo (WALLER et al., 2021).

A busca por novas terapias a partir de fármacos que já são utilizados em tratamentos de outras condições é extremamente importante, principalmente em doenças como a esporotricose, que não possui muitas opções terapêuticas. Dentre as vantagens, podemos citar a simplificação dos procedimentos regulatórios para a introdução no mercado de um medicamento previamente aprovado. Essa etapa considera dados previamente adquiridos, principalmente relacionados a segurança e toxicidade do medicamento, o que pode tornar as fases iniciais de desenvolvimento de um medicamento reposicionado mais rápidas e, portanto, mais baratas, além de aumentar as chances de introdução no mercado (BRILHANTE et al., 2018b; JOURDAN et al., 2020; PARISI et al., 2020; LEE et al., 2020; WALLER et al., 2021; RODRIGUES et al., 2022).

Os estudos que buscam novas moléculas ou o redirecionamento de fármacos para o tratamento da esporotricose tem aumentado, sendo um reflexo da necessidade de se buscar

novas estratégias terapêuticas. Dentre os estudos na área, alguns mostram produtos naturais e fármacos reposicionados com atividades promissoras frente *Sporothrix* spp., como Farnesol (BRILHANTE et al., 2014a), Miltefosina (BRILHANTE et al., 2014b, 2019a) Pentamidina (BRILHANTE et al., 2018b) e Ibuprofeno (BORBA-SANTOS et al., 2021; RODRIGUES et al., 2022). Isso reforça a importância do reposicionamento de fármacos e a busca contínua para novas terapias para a esporotricose.

2.6.1 Os inibidores da bomba de prótons

Os inibidores da bomba de prótons (IBPs) são uma classe de fármacos, e são os principais medicamentos utilizados para o tratamento de distúrbios de secreção de ácidos gastrointestinais. O primeiro IBP introduzido no mercado foi o omeprazol em 1989, seguido pelo lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol, esomeprazol, dexlansoprazol e Ilaprazol (Figura 10). O sistema de bomba de prótons é uma proteína de membrana integral que é capaz de capturar prótons da matriz e liberar os prótons no espaço intermembranar, estabelecendo um potencial eletroquímico. IBPs atuam bloqueando seletivamente a enzima H⁺/K⁺-ATPase (JUWAIED et al., 2011; KUMML et al.; 2013; VANDERAH, 2022).

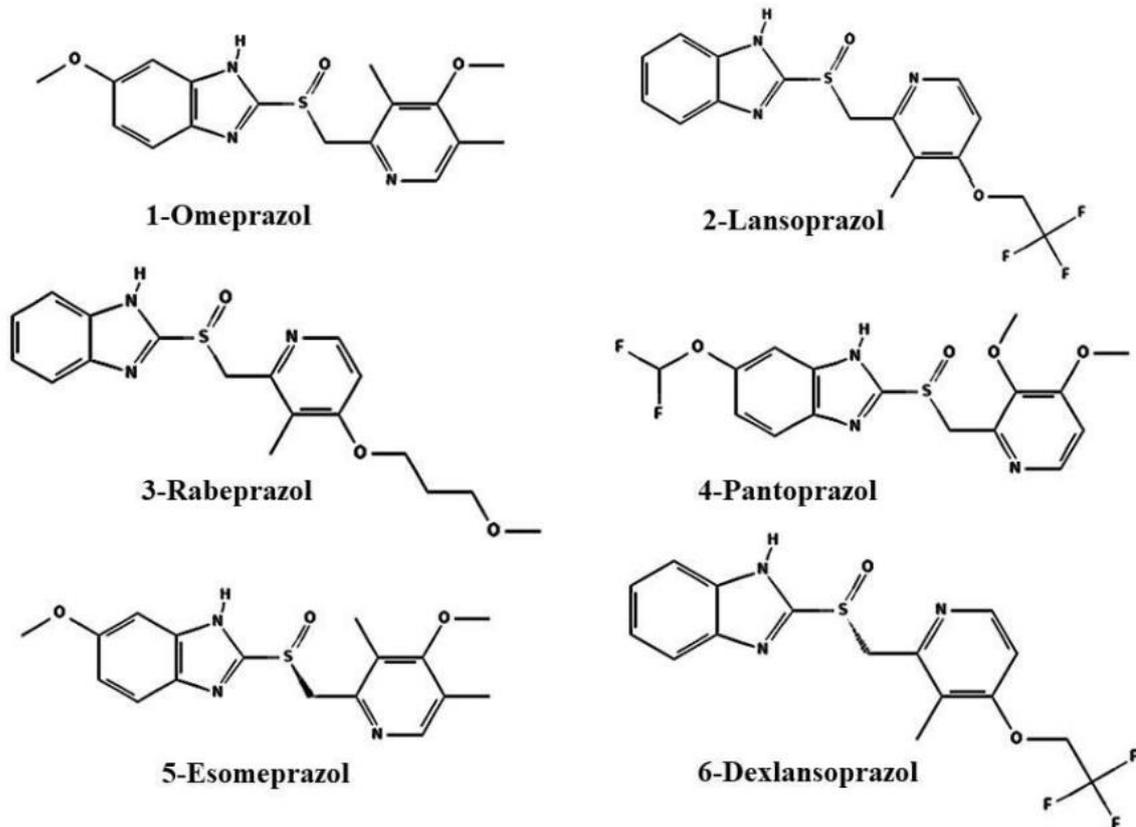
Os IBPs são pró-fármacos, e para que sejam ativados é necessário um ambiente ácido. Ele penetra na célula parietal a partir do sangue e se acumula nos secretores ácidos da célula parietal, reagindo com a K⁺ / H⁺ -ATPase, atuando assim na inibição da produção ácida. A inibição da bomba de prótons é irreversível, suprimindo a secreção ácida até que novas bombas de prótons sejam sintetizadas (GOODMAN; GILMAN, 2010; BRAGA; SILVA; ADAMS, 2011; KATZUNG; VANDERAH, 2022).

Baseado no mecanismo de ação, os anéis piridina e benzimidazol, são essenciais na atividade dos IBPs, e os seus equivalentes em ambos os anéis são o que determina o nível de toxicidade e sua velocidade de conversão para a forma ativa (MINER et al., 2003; BRAGA et al., 2011).

Apesar de serem da mesma classe de fármacos, existem diferenças em suas atividades farmacológicas. O pantoprazol é um fármaco mais previsível, com rápida ação e biodisponibilidade mais estável (HARTMANN et al., 1996). Já o rabeprazol tem um processo de ativação mais rápido, conseguindo acelerar a inibição do funcionamento da enzima. Outra diferença é que o rabeprazol se mostrou ser 10 vezes mais potente que omeprazol e lansoprazol na inibição da enzima urease bacteriana. Além disso, estudos mostram que o rabeprazol inibe a motilidade sobre *Helicobacter pylori*, bactéria caracteristicamente relacionada a infecções

gástricas (TSUTSUI et al, 2000; BARTH; HAHNE, 2002; RANG et al., 2020; KATZUNG; VANDERAH, 2022).

Figura 10: Estrutura dos inibidores da bomba de prótons.



Fonte: Katzung; Vanderah, 2022

Na busca pelo reposicionamento de fármacos, os IBPs já se mostraram promissores ao melhorar a eficácia de agentes anticancerígenos, quando utilizados em conjunto com quimioterapia. Além disso, já foi demonstrado também atividade antifúngica dos IBPs. Estudos demonstraram a atividade antifúngica do omeprazol em *Candida albicans*, quando administrados em concentrações específicas, além disso, demonstrou melhorar o efeito de itraconazol quando testado a interação dos dois (KUUMML et al., 2013). Em outro estudo, foi demonstrado a atividade antifúngica dos IBPs frente *Aspergillus niger* e *Trichophyton rubrum*, indicando que seu efeito pode ser devido a despolarização da membrana, causada pelos IBPs (JUWAIED et al., 2011), além de demonstrarem também a inibição da produção de melanina, um fator de virulência, em *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, indicando seu potencial como antifúngico (BRILHANTE et al., 2017; BRILHANTE et al., 2019b).

Tendo em vista que não há estudos sobre o efeito dos IBPs na sensibilidade e na

melanogênese frente *Sporothrix* spp. e que estes compostos são fármacos amplamente utilizados na prática médica, o estudo dos efeitos de IBPs sobre a sensibilidade e melanogênese de *Sporothrix* spp. pode despertar para uma nova estratégia de combate a esse importante fator de virulência fúngica.

3 HIPÓTESES

- Os inibidores da bomba de prótons possuem potencial antifúngico, *in vitro*, frente células planctônicas e biofilmes de *Sporothrix* spp.
- Os inibidores de bombas de prótons apresentam sinergismo com os antifúngicos anfotericina B, itraconazol e terbinafina, frente células planctônicas de *Sporothrix* spp.
- Os inibidores de bombas de prótons inibem a melanogênese de cepas de *Sporothrix* spp.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de inibidores de bomba de prótons sobre a sensibilidade e melanogênese de *Sporothrix* spp., bem como suas interações com antifúngicos de uso clínico.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil de sensibilidade de células planctônicas e biofilmes de *Sporothrix* spp., aos inibidores de bomba de prótons.
- Determinar o efeito da combinação dos inibidores de bomba de prótons com os antifúngicos anfotericina B, itraconazol e terbinafina.
- Averiguar os efeitos dos inibidores de bomba de prótons sobre a melanogênese de *Sporothrix* spp.

5 METODOLOGIA

5.1 Local de estudo

As pesquisas foram realizadas nos laboratórios do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará (UFC).

5.2 Microrganismos

Neste estudo, foram utilizadas um total de 12 cepas do clado clínico de *Sporothrix* spp., sendo 06 *S. brasiliensis*; 03 *S. schenckii*; e 03 *S. globosa* (Tabela 1), pertencentes a coleção de cultura do Centro Especializado em Micologia Médica, da Universidade Federal do Ceará.

Tabela 1: Origem de isolamento das cepas de espécies do clado clínico de *Sporothrix* spp. utilizadas nesse estudo

Cepas	Espécies	Isolamento
CEMM 05-3-050	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Felino
CEMM 05-3-052	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão
CEMM 05-3-053	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Felino
CEMM 05-3-075	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Felino
CEMM 05-3-078	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Felino
CEMM 05-3-088	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Humano
CEMM 05-4-004	<i>Sporothrix globosa</i>	Humano
CEMM 05-4-005	<i>Sporothrix globosa</i>	Humano
CEMM 05-4-006	<i>Sporothrix globosa</i>	Humano
CEMM 05-3-095	<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i>	Humano
CEMM 05-3-048	<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i>	Humano
CEMM 05-4-002	<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i>	Solo

Lista de cepas de *Sporothrix* spp. utilizados nos experimentos.

Para o cultivo da forma filamentosa, o fungo foi mantido por repiques em ágar batata dextrose a 28-30 °C. Foram utilizadas as cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 como controles nos experimentos de sensibilidade antifúngica.

5.3 Antifúngicos e inibidores da bomba de prótons

Foram utilizados para o estudo cinco inibidores de bomba de prótons, o omeprazol (OMP), rabeprazol (RBP), esomeprazol (ESP), lansoprazol (LSP) e pantoprazol (PTP). Os agentes antifúngicos foram os utilizados para o tratamento da esporotricose, sendo eles o itraconazol (ITC), terbinafina (TRB) e anfotericina B (AMB). Todos os fármacos citados foram adquiridos na Sigma-Aldrich (EUA). Para os IBPs, a solução estoque foi diluída em solução de DMSO estéril, com concentração final de 25.000 µg/mL, ficando estocadas a – 20 °C até o seu momento de uso. Já os antifúngicos foram preparados como descrito e recomendado nos documentos do CLSI M38-A2 (CLSI, 20017a).

5.4 Teste de sensibilidade em células planctônicas e biofilmes

Os testes de sensibilidade de *Sporothrix* spp. frente aos antifúngicos e inibidores da bomba de prótons foram realizados com base nos protocolos M38-Ed3 (forma filamentosa) do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017a), com adaptações. As drogas utilizadas foram os antifúngicos anfotericina B (AMB), itraconazol (ITC) e terbinafina (TRB) nas concentrações de 0,03 a 16 µg/ml, e os inibidores de bombas de prótons nas concentrações de 0,5 a 512 µg/ml. A CIM (concentração inibitória mínima) foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% (AMB e ITC), 80% (TRB) e 50% (IBPs) do crescimento de fungos. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 foram utilizados como controle de qualidade dos testes (CLSI, 2017a).

Para formação dos biofilmes filamentosos, foram utilizadas a metodologia descrita por Brilhante et al. (2018a). Uma alíquota de 200 µL de suspensão fúngica a 1×10^6 conídios/mL foi preparada em meio RPMI 1640 e adicionada a microplacas de 96 poços e incubado em estufa a 35 °C durante 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 96 horas, para formação e maturação do biofilme. Os biofilmes foram expostos aos antifúngicos nas concentrações de 0,25 a 256 µg/ml, e os IBPs nas concentrações de 0,5 a 512 µg/ml por 72 horas, nas mesmas condições de temperatura em que foram formados (BRILHANTE et al., 2018a). Após os tratamentos, os biofilmes foram avaliados pelas técnicas de cristal violeta e ensaio de redução de MTT., como descrito por Brilhante et al. (2019a).

5.5 Ensaio de combinação de drogas – *checkerboard*

Para avaliação das interações entre os inibidores de bombas de prótons e os antifúngicos AMB, ITC e TRB, foram utilizadas duas cepas de cada espécie de *Sporothrix* spp. (n = 6), na forma filamentosa, aplicando o método de microdiluição em caldo por *checkerboard* (tabuleiro de xadrez) de 7 linhas x 11 colunas (ALMEIDA-PAES et al., 2016).

Foram utilizadas combinações de concentrações variáveis de IBPs de 4 a 256 µg/ml, combinados com 0,03 a 16 µg/ml AMB, ITC ou TRB. Os inóculos, os tempos e temperaturas de incubação serão os mesmos descritos anteriormente para os testes das drogas isoladas (BRILHANTE et al., 2018). Os valores de CIM obtidos determinam o índice de concentração inibitória fracionária (FICI). As interações foram definidas como sinérgicas (SIN) quando apresentaram $FICI \leq 0,5$, indiferentes quando $0,5 < FICI < 4$ e antagonistas quando $FICI \geq 4$ (ODDS, 2003).

5.6 Melanização de células planctônicas de *Sporothrix* spp.

A melanização de células planctônicas foi induzida com base na metodologia descrita por Brilhante et al. (2017a). As cepas de *Sporothrix* spp. foram ressuspendidas em meio mínimo (glicose 0,015 mol/l, MgSO₄ 0,01 mol/l, K₂HPO₄ 0,0294 mol/l, glicina 0,013 mol/l e tiamina 0,003 mol/l, pH 5,5), atingindo a turbidez correspondente a 3 na escala de McFarland. Posteriormente, 200 µl do inóculo foram depositados em placas de 24 poços contendo meio mínimo ágar suplementado com L-dopa (1 mM). As placas foram então incubadas a 35 °C durante 15 dias. A produção de melanina foi avaliada por meio da análise em escala de cinza utilizando o software ImageJ versão 1.51g e os valores obtidos convertidos em porcentagem de preto (BRILHANTE et al., 2017a).

5.7 Efeito dos inibidores de bombas de prótons na melanização de *Sporothrix* spp.

A produção de melanina por células planctônicas na presença de IBPs foi avaliada com base no protocolo de melanização descrito anteriormente, com algumas modificações. Os inóculos foram preparados como descrito anteriormente e adicionados em placas de 24 poços contendo meio mínimo ágar (ensaio com células planctônicas) suplementados com L-dopa (1 mM) na presença ou ausência de IBPs em concentrações sub-inibitórias definidas previamente no teste de sensibilidade. A produção de melanina foi avaliada como descrito anteriormente

(BRILHANTE et al., 2017a, MARIO et al., 2015).

5.8 Melanização na presença de cobre e de inibidores da bomba de prótons

A capacidade dos inibidores de bombas de prótons em inibir a melanização de *Sporothrix* spp. na presença de diferentes concentrações de sulfato de cobre foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Brilhante et al. (2018a), com modificações. Placas de 24 poços com meio mínimo ágar foram preparadas como descrito anteriormente, contendo sulfato de cobre (1 a 200 μM) e/ou CIM/2 dos IBPs. Placas com meio sem cobre e IBPs foram utilizados como controle. A incubação das placas e sua posterior quantificação de melanina foram realizadas como descrito anteriormente.

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% ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 Teste de sensibilidade em células planctônicas

Os IBPs apresentaram atividade inibitória frente as espécies de *Sporothrix* spp. na forma filamentosa (Tabela 2). Os valores de CIM dos IBPs para a forma filamentosa variaram de 32 a 256 µg/ml para o omeprazol, 32 a 128 µg/ml para o rabeprazol, 64 a 256 µg/ml para o lansoprazol, 64 a 512 µg/ml para esomeprazol e 128 a 512 µg/ml para pantoprazol. Para as drogas antifúngicas os valores de CIM tiveram variação de 0,25 a 4 µg/ml para itraconazol, 0,03 a 0,25 µg/ml para terbinafina e 0,25 a 2 µg/ml para anfotericina B. Os resultados são apresentados na tabela abaixo. A partir dos resultados obtidos na sensibilidade foi decidido realizar os experimentos com os inibidores da bomba de prótons que apresentaram os menores MICs, sendo eles o omeprazol e o rabeprazol.

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima dos inibidores da bomba de prótons frente as espécies de *Sporothrix* spp. na forma filamentosa.

Espécies	Cepas (CEMM)	Concentração inibitória mínima (µg/ml)							
		AMB	ITC	TRB	OMP	RBP	LSP	ESP	PTP
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	05-3-050	2	1	0,0315	128	64	128	128	512
	05-3-052	2	1	0,0315	128	32	256	128	512
	05-3-053	2	1	0,25	32	128	128	256	256
	05-3-075	0,5	0,25	0,0625	128	64	128	512	256
	05-3-078	0,25	1	0,25	64	128	256	256	256
	05-3-088	2	4	0,25	256	64	256	128	256
<i>Sporothrix globosa</i>	05-4-004	2	1	0,0625	32	64	256	256	256
	05-4-005	0,5	2	0,25	64	64	256	128	256
	05-4-006	2	1	0,25	128	128	128	64	128
<i>Sporothrix schenckii</i>	05-3-095	1	0,5	0,125	128	128	128	128	128
	05-3-048	1	0,5	0,25	128	128	128	128	256
	05-3-002	1	0,5	0,125	64	128	128	256	128

CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica. AMB: Anfotericina B. ITC: Itraconazol. TRB: Terbinafina. OMP: Omeprazol. RBP: Rabeprazol. LSP: Lansoprazol. ESP: Esomeprazol. PTP: Pantoprazol.

6.2 Ensaio de combinação de drogas – checkerboard

Foi realizado também teste de interação entre o OMP e os antifúngicos AMB, ITC e TRB, como apresentado na tabela 3. O OMP apresentou sinergismo com AMB em 4 cepas e em 2 cepas com terbinafina, alcançando reduções de 16 vezes no CIM de OMP. As interações entre OMP e ITC se mostraram indiferentes. Não houve nenhuma interação antagônica entre as

combinações testadas.

Tabela 3: Concentração inibitória mínima dos OMP combinado com os antifúngicos frente as espécies de *Sporothrix* spp. na forma filamentosa.

Espécies	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/ml}$)							Interpretação FICI		
	Drogas isoladas				Drogas combinadas					
	OMP	AMB	ITC	TRB	OMP/AMB	OMP/ITC	OMP/TRB	OMP/AMB	OMP/ITC	OMP/TRB
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	128	0,5	1	0,25	16/0,125	64/1	64/0,25	SIN	IND	IND
<i>Sporothrix schenckii</i>	64	2	1	0,25	8/0,5	16/0,5	16/0,25	SIN	IND	IND
<i>Sporothrix globosa</i>	128	1	0,5	0,25	32/0,5	64/0,5	16/0,0625	IND	IND	SIN
	64	1	0,5	0,125	16/0,5	16/0,5	32/0,125	IND	IND	IND
	64	2	1	0,25	16/0,5	32/0,5	8/0,0624	SIN	IND	SIN
	128	2	1	0,25	32/0,125	32/1	32/0,25	SIN	IND	IND

AMB: Anfotericina B. ITC: Itraconazol. TRB: Terbinafina. OMP: Omeprazol. RBP: Rabeprazol.

6.3 Teste de sensibilidade em biofilmes

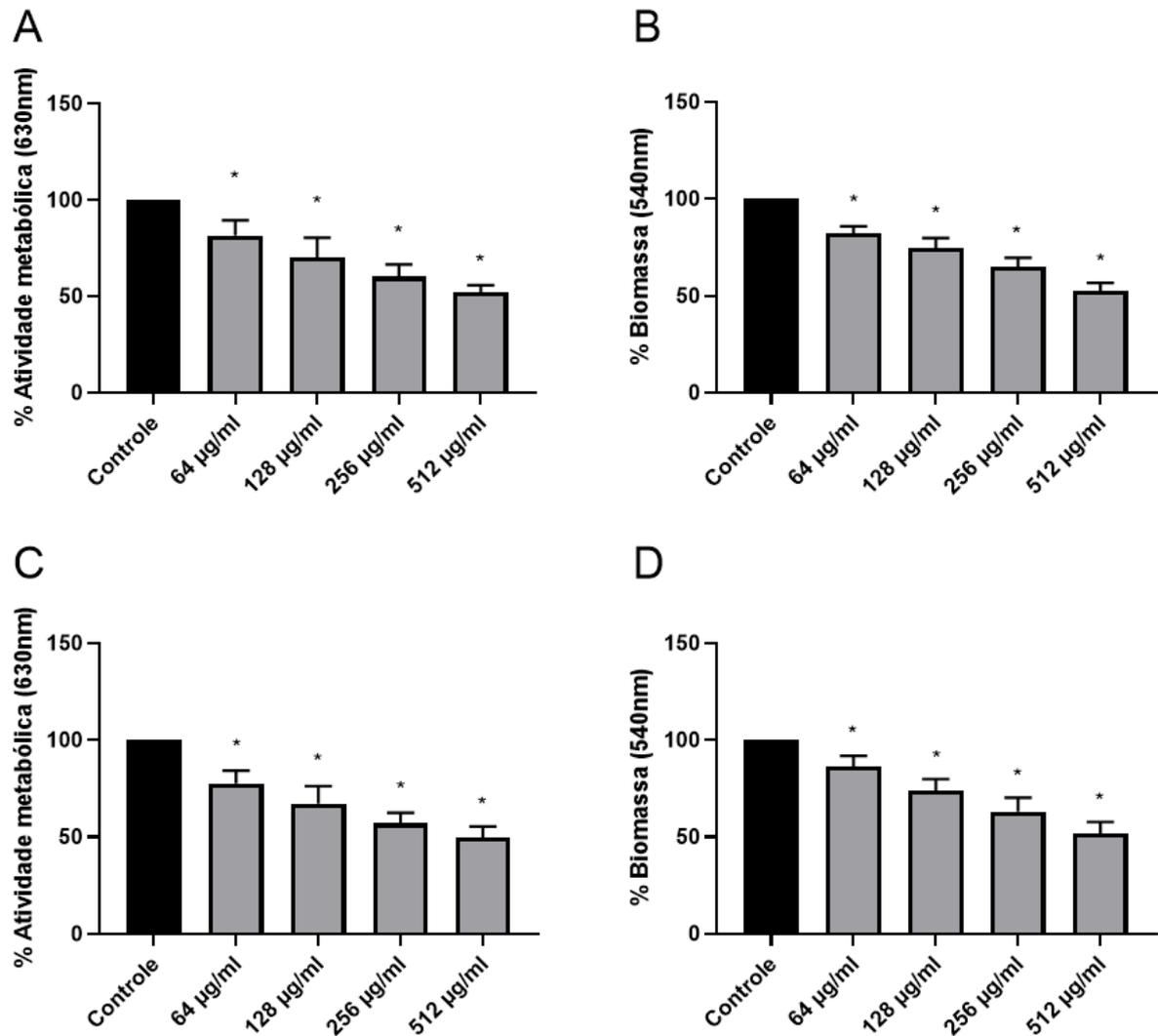
Nos testes realizados para avaliar a sensibilidade dos biofilmes formados de espécies de *Sporothrix* spp. aos IBPs Omeprazol (OMP) e Rabeprazol (RBP), foi realizado a avaliação da atividade metabólica e da biomassa, onde foram observadas reduções, como apresentado na Figura 11.

Reduções significativas na atividade metabólica foram observadas a partir da concentração de 64 $\mu\text{g/ml}$ para o OMP e para o RBP ($p < 0,05$), com redução máxima de 52% para OMP e 50% para RBP na concentração de 512 $\mu\text{g/ml}$. Com relação a biomassa, também houve reduções significativas a partir da concentração de 64 $\mu\text{g/ml}$ para o OMP e RBP ($p < 0,05$), com reduções máximas de 53% e 51% para OMP e RBP, na concentração de 512 $\mu\text{g/ml}$.

6.4 Efeito dos inibidores de bombas de prótons na melanização de *Sporothrix* spp.

Os resultados dos inibidores da bomba de prótons sobre a melanização de espécies de *Sporothrix* spp. estão na Figura 12. Para fins de padronização, foram utilizadas concentrações de 64 $\mu\text{g/ml}$ para todos os IBPs, baseado nos resultados obtidos na sensibilidade. O Omeprazol foi capaz de inibir a produção de melanina em todas as espécies, conseguindo reduções até 54% da escala de cinza. Já o IBP Rabeprazol não foi capaz de inibir a produção de melanina.

Figura 11 - Atividade metabólica e biomassa de biofilmes de *Sporothrix* spp.



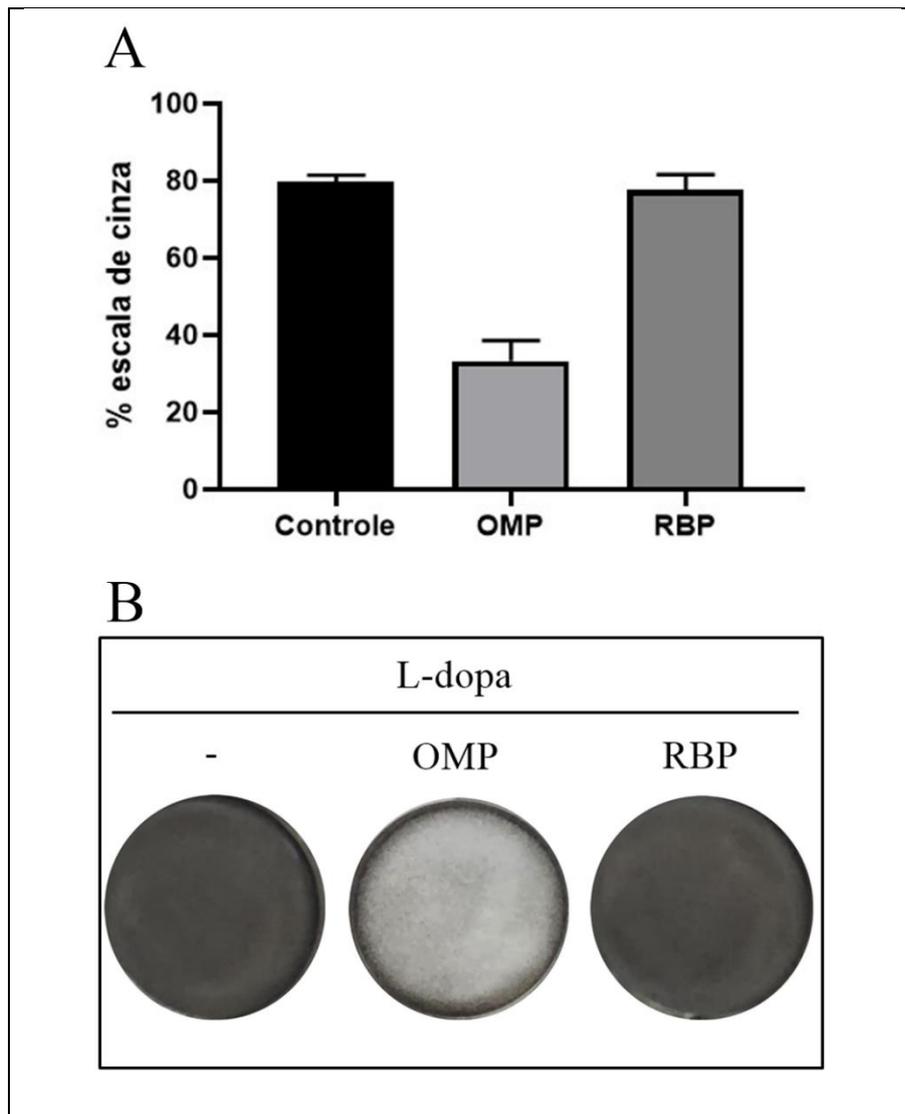
Atividade metabólica e biomassa de biofilmes de *Sporothrix* spp. expostos a diferentes concentrações de OMP e RBP. A: Atividade metabólica do biofilme exposto ao omeprazol (OMP). B: Biomassa do biofilme exposto ao OMP. C: Atividade metabólica de biofilme exposto ao rabeprazol (RBP). D: biomassa do biofilme exposto ao RBP. As barras pretas correspondem ao biofilme não tratado (controle). As barras cinzas correspondem aos biofilmes tratados com OMP ou RBP. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. *Diferença significativa em comparação com o controle ($p < 0,05$)

6.5 Melanização na presença de cobre e de inibidores da bomba de prótons

Com o objetivo de compreender o possível mecanismo que faz o Omeprazol inibir a produção de melanina de espécies de *Sporothrix* spp., foi adicionado sulfato de cobre em diferentes concentrações juntamente com o Omeprazol, como representado na Figura 13. É possível observar que a adição do sulfato de cobre causou um aumento escala de cinza em todas

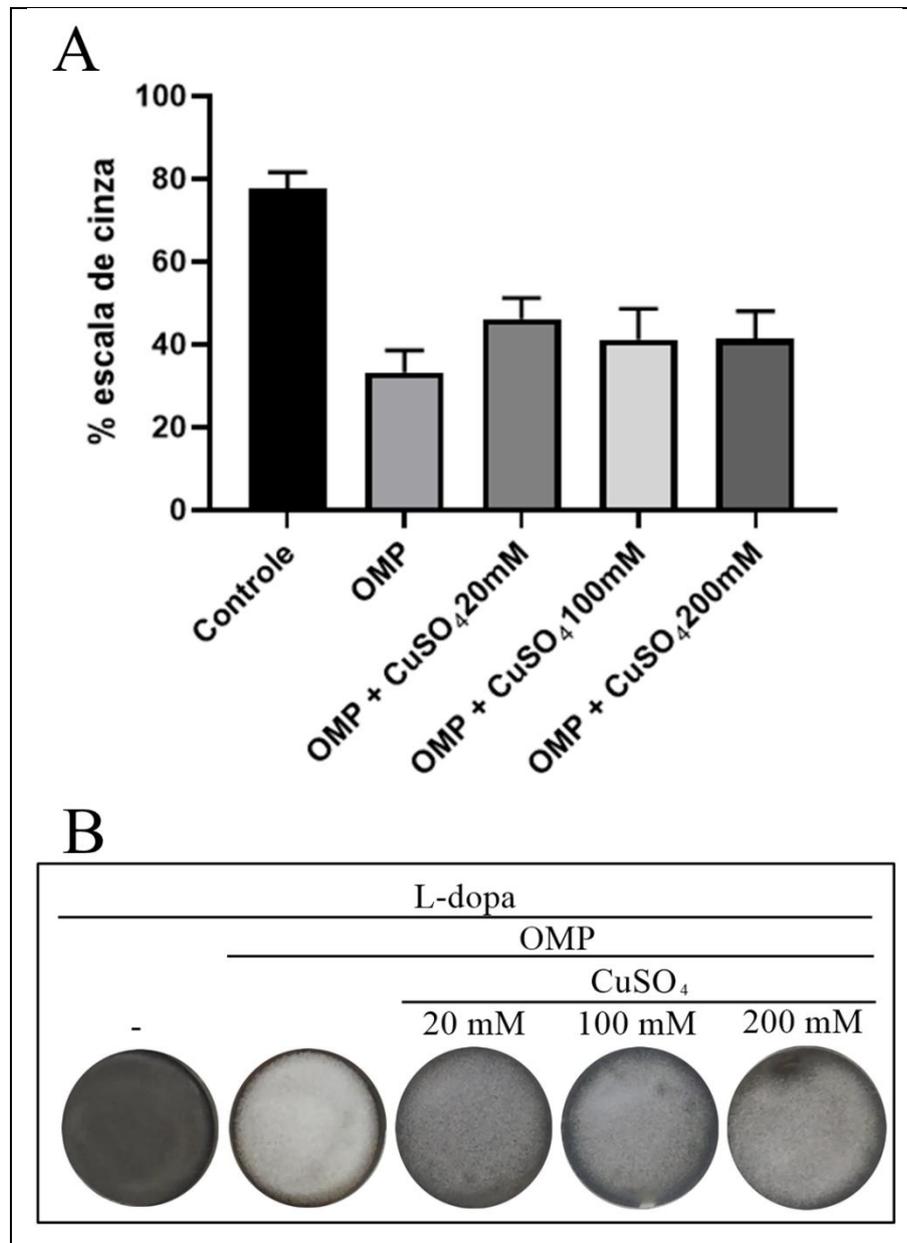
as espécies de *Sporothrix* spp., se comparado ao tratamento apenas com o Omeprazol. O maior aumento foi observado com a concentração de 20 μg de CuSO_4 *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix brasiliensis*. No entanto, não houve aumento significativa em relação a condição apenas com o omeprazol

Figura 12 - Efeito do Omeprazol e Rabeprazol na inibição da produção de melanina em espécies de *Sporothrix* spp.



Efeito do Omeprazol e Rabeprazol na inibição da produção de melanina em espécies de *Sporothrix* spp. A: As barras pretas representam o crescimento em meio mínimo suplementado com L-dopa (controle) e barras cinzas com a adição de um inibidor da bomba de prótons. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. B: Imagem representativa das condições descritas.

Figura 13 - Efeito do sulfato de cobre na inibição da produção de melanina pelo omeprazol em espécies de *Sporothrix* spp.



Efeito do sulfato de cobre na inibição da produção de melanina pelo Omeprazol em espécies de *Sporothrix* spp. A: As barras representam o crescimento em meio mínimo suplementado com L-dopa (controle); adicionado de omeprazol; adicionado de omeprazol e de sulfato de cobre (CuSO₄) em diferentes concentrações (20µM, 100µM e 200µM). Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. B: Imagem representativa das condições descritas.

7 DISCUSSÃO

Os IBPs estão entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo e são usados para o tratamento de doenças relacionadas à acidez (KINOSHITA; ISHIMURA; ISHIHARA, 2018). Em nosso estudo, apresentamos o efeito de IBPs sobre a sensibilidade e melanogênese de *Sporothrix* spp. Os IBPs apresentaram MICs que variaram de 32 µg/ml a 256 µg/ml, com destaque para o omeprazol, com concentrações de 32 a 256 µg/ml e para o rabeprazol, com concentrações de 32 a 128 µg/ml. Ao se observar outros estudos relacionados a sensibilidade de fungos aos IBPs, como o de Liu and Kohler (2016), foi demonstrado a redução do crescimento em *C. albicans* quando tratada com concentrações semelhantes de omeprazol e rabeprazol (aproximadamente 138 µg/ml). Além disso, também apresentou resultados semelhantes com *Cryptococcus* spp. (BRILHANTE et al., 2019), *Aspergillus niger* e *Trichophyton rubrum* (JUWAIED et al., 2011). Os IBPs já possuem uma atividade antifúngica bem conhecida por inibir a bomba de prótons da membrana plasmática fúngica (Liu; Kohler, 2016).

Além da inibição do crescimento de *Sporothrix* spp., os IBPs apresentaram sinergia com drogas antifúngicas utilizadas no tratamento da esporotricose. As interações do OMP com os antifúngicos foram capazes de reduzir em até 16 vezes as concentrações de AMB e TRB frente *Sporothrix* spp. Essa interação dos IBPs com antifúngicos já foi observado em outros estudos realizados com *C. albicans* (Liu; Kohler, 2016). Atualmente existem diversos casos de falhas terapêuticas no tratamento da esporotricose, havendo relatos de resistência a itraconazol, terbinafina e anfotericina B. Na maioria desses casos, a resistência está relacionada a concentração do medicamento, sendo necessário o aumento da dose para que o medicamento consiga ter o efeito esperado no tratamento da doença. Entretanto, visto que há sinergia dos IBPs com os antifúngicos, é possível que sua utilização conjunta permitisse que as doses dos antifúngicos sejam mantidas ou até reduzidas, fazendo com que não houvesse a necessidade de aumento da dose para esses casos (WALLER et al., 2021). Contudo, mais estudos são necessários para se entender melhor a interação entre o omeprazol e os antifúngicos anfotericina B e terbinafina, além de seus efeitos frente *Sporothrix* spp.

Nós também investigamos o efeito dos IBPs frente biofilmes de *Sporothrix* spp. Em estudos para se compreender melhor o biofilme de *Sporothrix* spp., foram observados que os biofilmes são robustos e se mostram até 50 vezes mais resistentes às drogas testadas quando comparados a células planctônicas. Além disso, é possível observar que existem diferenças na

composição da parede celular das células leveduriformes e filamentosas que podem afetar a susceptibilidade aos antifúngicos, como a quantidade de melanina presente (BRILHANTE et al., 2018a; 2019a).

Os IBPs OMP e RBP reduziram o biofilme em aproximadamente 50% na maior concentração testada. Outros estudos já haviam demonstrado o efeito antibiofilme dos IBPs em microorganismos como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, onde foi observado um efeito anti formação de biofilme e antibiofilme (SINGH, 2012). Além disso, em outros estudos com *C. albicans* também demonstraram o efeito antibiofilme de IBPs atuando tanto isoladamente quanto em conjunto com antifúngicos (LU et al., 2020). O mecanismo de ação nesses casos está relacionado diretamente com a supressão da atividade de bombas de efluxo pelos IBPs, o que permite que os antifúngicos consigam atuar diretamente nas células dentro do biofilme (LU et al., 2020).

Os biofilmes dificultam o tratamento, atuando como uma barreira que impede ou dificulta o acesso das moléculas, seja por impedimento, adsorção, inativação, neutralização ou expulsão. Além disso, os biofilmes também são considerados um dos responsáveis pelo desenvolvimento de resistência aos antifúngicos de escolha no tratamento. Devido a isso, os resultados do nosso estudo abrem novas perspectivas para o estudo dos inibidores da bomba de prótons como um antibiofilme, visto que há possibilidade de atuarem em conjunto com os antifúngicos utilizados no tratamento e assim reduzir casos de resistência e de ineficácia no tratamento da esporotricose (SINGH, 2012; BRILHANTE et al., 2018a; 2019a; Waller et al., 2021). Para isso, novos estudos precisam ser realizados para avaliar por completo sua atividade antibiofilme e sua interação com antifúngicos frente biofilmes de *Sporothrix* spp.

A melanina confere grandes vantagens aos organismos, como seu papel como fator de virulência. Em estudos, células não melanizadas de *Sporothrix* spp. são mais suscetíveis a serem engolfadas por monócitos humanos, além disso, conferem uma maior proteção a células fúngicas contra espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, que são compostos químicos liberados pelas células hospedeiras como mecanismo de defesa (ALMEIDA-PAES et al., 2015). Em outro estudo foi possível observar que cepas de *Sporothrix* spp. sem melanina causam menos progressão da esporotricose (MADRID et al., 2010), e devido a esses e outros fatores, foi proposto que a presença de melanina em *Sporothrix* spp. é um fator importante no desenvolvimento da micose (MADRID et al., 2010; GARCÍA-CARNERO et al., 2022).

Em outros estudos realizados com os fungos patogênicos humanos *H. capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* e *P. brasiliensis*, foi observado que cepas melanizadas apresentavam resistência a anfotericina B se comparadas com cepas não melanizadas (TABORDA et al., 2008).

Além disso, estudos com células melanizadas de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* apresentaram resistência aos antifúngicos terbinafina e anfotericina B, que são opções para o tratamento da esporotricose para casos de impossibilidade da utilização de itraconazol ou para casos graves, respectivamente (ALMEIDA-PAES et al., 2016; GARCÍA-CARNERO et al., 2022).

Em nosso estudo, foi observado que o OMP inibiu a melanização de *Sporothrix* spp., com reduções de até 54% na escala de cinza, o que segue em acordo com estudos feitos em *Cryptococcus* spp. (BRILHANTE et al., 2019), onde foram observados resultados semelhantes ao da inibição da melanização pelo omeprazol, assim como observado em *Sporothrix* spp em nosso estudo. No entanto, o rabeprazol não apresentou efeito na inibição da melanização em *Sporothrix* spp. Além disso, em nosso estudo, a adição do sulfato de cobre não apresentou um aumento significativo da escala de cinza, o que pode indicar que a captura de cobre não é o mecanismo de ação atuante para a inibição da produção de melanina pelo OMP em *Sporothrix* spp (BRILHANTE et al., 2019).

Em estudos feitos para avaliar a inibição da melanização pelos IBPs em melanócitos humanos, o mecanismo de ação do rabeprazol na inibição não foi completamente elucidado. No entanto, foi observado que estava fortemente relacionado a inibição da expressão de genes e da transcrição de enzimas associadas a melanogênese em mamíferos, e as diferenças na expressão desses genes e na transcrição de enzimas em *Sporothrix* spp. em relação a mamíferos podem estar relacionadas ao rabeprazol não apresentar efeito na inibição da melanização em *Sporothrix* spp. (BAEK; LEE, 2015). Já com relação ao omeprazol, foi observado em outros estudos que sua atuação na inibição da melanização não está relacionada a um único fator, mas apresenta um efeito conjunto de inibição da atividade da tirosinase, bloqueio de transporte e quelação do cobre, o que pode estar relacionado diretamente ao fato de a adição de sulfato de cobre não ter efeito significativo para que *Sporothrix* spp. voltasse a produzir melanina, visto que atividade da tirosinase ainda estaria inibida e ainda estaria havendo o bloqueio de transporte (BAEK; LEE, 2015).

Como um fator de resistência antifúngica, a melanina e suas vias de síntese podem passar a ser um alvo para o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos para terapias de esporotricose. Além disso, a melanina está relacionada dentre os possíveis fatores causadores de casos de resistência de *Sporothrix* spp. aos antifúngicos utilizados no tratamento para a esporotricose (WALLER et al., 2021). Um estudo mostrou que a melanina é um fator chave para prevenir a fagocitose de *S. globosa* por macrófagos, além disso, a melanina presente em *S. globosa* podem diminuir a expressão de receptores envolvidos no reconhecimento do fungo. Com isso, a presença de melanina na parede celular do patógeno reduz a possibilidade de o

hospedeiro combater o fungo, o que resulta também em uma diminuição da resposta pró-inflamatória do corpo (NEGRINI et al., 2014; GUAN et al., 2021).

Os resultados obtidos mostram que os inibidores da bomba de prótons apresentam atividade antifúngica frente espécies de *Sporothrix* spp., apresentando também sinergismo com os antifúngicos clássicos anfotericina B e terbinafina. Além disso possui também atividade antibiofilme e atua na inibição da melanogênese. Contudo, para elucidar completamente sua atividade como um antifúngico e na inibição da melanogênese, novos estudos acerca dessa atividade precisam ser realizados.

8 CONCLUSÃO

- Os inibidores da bomba de prótons omeprazol, rabeprazol, esomeprazol, lansoprazol e pantoprazol apresentam atividade antifúngica frente células planctônicas de espécies de *Sporothrix*;
- O omeprazol apresenta sinergismo com os antifúngicos anfotericina B e terbinafina frente células planctônicas de espécies de *Sporothrix*;
- Os inibidores da bomba de prótons omeprazol e rabeprazol possuem atividade antibiofilme frente espécies de *Sporothrix*, com reduções na biomassa e atividade metabólica.
- O omeprazol é capaz de inibir a melanização em espécies de *Sporothrix*.

9 PERSPECTIVAS

A atividade antifúngica, antibiofilme e de inibição da melanogênese dos IBPs frente *Sporothrix* spp. trazem diversas questões acerca dos fatores de virulência de *Sporothrix* spp., bem como a atuação conjunta e a realocação de fármacos. Estudos posteriores para avaliar o efeito dos IBPs sobre a sensibilidade e melanogênese de *Sporothrix* spp. são necessários para que seja elucidado e compreendido melhor os mecanismos de ação e sua interação com os antifúngicos utilizados no tratamento da esporotricose.

Foram publicados recentemente estudos que apresentam casos de falha terapêutica no tratamento da esporotricose (WALLER et al., 2021) e, em contrapartida, também são publicados estudos acerca de fármacos novos ou realocados com potencial para o tratamento da esporotricose. Dessa forma, mais estudos acerca da realocação de fármacos, nesse caso em específico os IBPs, se fazem necessário para que a terapêutica da doença possa ser melhorada e para uma melhor compreensão sobre as possibilidades de tratamento.

10 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, B. A. et al. First case report of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in the state of Ceará–Brazil. **Medical Mycology Case Reports**, 2023.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in the presence of L-tyrosine. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8623-8630, 2012.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Melanin biosynthesis in pathogenic species of *Sporothrix*. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 50-59, 2017.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0152796, 2016.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.
- ARENAS, R. et al. Sporotrichosis: from KOH to molecular biology. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 62, 2018.
- BAEK, S.H.; LEE, S.H. Proton pump inhibitors decrease melanogenesis in melanocytes. **Biomedical reports**, v. 3, n. 5, p. 726-730, 2015.
- BALTAZAR, L. M. et al. Melanin protects *Paracoccidioides brasiliensis* from the effects of antimicrobial photodynamic inhibition and antifungal drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 4003-4011, 2015.
- BARROS, M.B.L. et al. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. **Epidemiology & Infection**, v. 136, n. 9, p. 1192-1196, 2008.
- 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.
- BARTH, J.; HAHNE, W. Rabeprazole-based therapy in *Helicobacter pylori* eradication. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 16, p. 31-33, 2002.
- BATTIN, T.J. et al. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 251-263, 2016.
- BAYRY, J. (Ed.). **Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of Livestock**. Springer, 2017.
- BERNARDES-ENGEMANN, A.R. et al. Validation of a serodiagnostic test for sporotrichosis: a follow-up study of patients related to the Rio de Janeiro zoonotic outbreak. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 28-33, 2015.
- BONIFAZ, A.; TIRADO-SÁNCHEZ, A. Cutaneous disseminated and extracutaneous

sporotrichosis: current status of a complex disease. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 6, 2017.

BORBA-SANTOS, L.P. et al. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. **Sabouraudia**, v. 53, n. 2, p. 178-188, 2014.

BORBA-SANTOS, L.P. et al. Anti-*Sporothrix* activity of ibuprofen combined with antifungal. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 101-106, 2021.

BRAGA, M.P.; SILVA, C.B.; ADAMS, A.I.H. Inibidores da bomba de prótons: Revisão e análise farmacoeconômica. **Saúde (Santa Maria), Ahead of Print**, v. 37, n. 2, p. 1932, 2011.

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.; CASTELOBRANCO, 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, 2018a.

BRILHANTE, R. S.; PEREIRA, V. S.; OLIVEIRA, J. S.; LOPES, R. G.; RODRIGUES, A. M.; CAMARGO, Z. P.; PEREIRA-NETO, W. A.; CASTELO-BRANCO, D. S.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. Pentamidine inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. **Future Microbiol.**, v. 13, n. 10, p. 1–12, 2018b

BRILHANTE, R.S.N. et al. Biofilm formation on cat claws by *Sporothrix* species: An ex vivo model. **Microbial Pathogenesis**, v. 150, p. 104670, 2021.

BRILHANTE, R.S.N. et al. In vitro inhibitory activity of terpenic derivatives against clinical and environmental strains of the *Sporothrix schenckii* complex. **Sabouraudia**, v. 53, n. 2, p. 93-98, 2014a.

BRILHANTE, R.S.N. et al. In vitro inhibitory effect of miltefosine against strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Sporothrix* spp. **Medical Mycology**, v. 52, n. 3, p. 320-325, 2014b.

BRILHANTE, R.S.N. et al. Potassium iodide and miltefosine inhibit biofilms of *Sporothrix schenckii* species complex in yeast and filamentous forms. **Medical mycology**, v. 57, n. 6, p. 764-772, 2019a.

BRILHANTE, R.S.N. et al. An alternative method for the analysis of melanin production in *Cryptococcus neoformans* sensu lato and *Cryptococcus gattii* sensu lato. **Mycoses**, v. 60, n. 10, p. 697-702, 2017.

BRILHANTE, R.S.N. et al. Proton pump inhibitors versus *Cryptococcus* species: effects on in vitro susceptibility and melanin production. **Future Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 489-497, 2019.

BROWN, R.; BOWEN, J.W.; WEINTROUB, D.; CLUVER, E.H.; et al. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. In **Proceedings of the Transvaal Mine Medical Officer's Association**, pp. 1–67. 1947.

CARMICHAEL J. W. 1962. *Chrysosporium* and some other aleuriosporic Hyphomycetes. **Can. J. Bot.** 40:1137–1173. 1962

CAROLUS, H. et al. Amphotericin B and other polyenes—Discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321, 2020.

CASTRO, R.A. et al. Differences in cell morphometry, cell wall topography and Gp70 expression correlate with the virulence of *Sporothrix brasiliensis* clinical isolates. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e75656, 2013.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi ; Approved Standard – 3rd edn**. CLSI document M38ed3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017a.

DA CRUZ BAHIANSE ROCHA, I. et al. Molecular-based assessment of diversity and population structure of *Sporothrix* spp. clinical isolates from Espírito Santo-Brazil. **Mycoses**, v. 64, n. 4, p. 420-427, 2021.

DE BEURMANN, L.; GOUGEROT, H.; VAUCHER, A. B. Sporotricose expérimentale du chat. **Comptes Rendus Des Seances La Soc. Biol.**, v. 66, n. 1, p. 370–372, 1909.

DE CARVALHO, J.A. et al. Trends in molecular diagnostics and genotyping tools applied for emerging *Sporothrix* species. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 8, p. 809, 2022.

DELLA TERRA, P.P. et al. Development and evaluation of a multiplex qPCR assay for rapid diagnostics of emerging sporotrichosis. **Transboundary and emerging diseases**, v. 69, n. 4, p. e704-e716, 2022.

DONADEL K, REINOSO Y, OLIVEIRA J, AZULAY R. Esporotricose: revisão. **An Bras Dermatol**, v. 68(1):45-52. 1993.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Multicenter, international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values for *Sporothrix* species identified by molecular methods. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 10, p. e01057-17, 2017.

FLÓREZ-MUÑOZ, S. V; ALZATE, J. F.; MESA-ARANGO, A. C. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility of Clinical Isolates of *Sporothrix schenckii* Complex in Medellin, Colombia. **Mycopathologia**, v. 184, n. 1, p. 53–63, 2019.

FRANCESCONI, G. et al. Comparative study of 250 mg/day terbinafine and 100 mg/day itraconazole for the treatment of cutaneous sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 171, p. 349-354, 2011.

FREITAS D, MIGLIANO M, ZANI NETO L. Esporotricose - Observação de caso espontâneo em gato doméstico (*F. catus*). **Rev Fac Med Vet Univ São Paulo**. 5(4):601-604. 1956.

GARCÍA-CARNERO, L.C.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J.A.. Virulence factors of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 3, p. 318, 2022.

GEZUELE, E.; DA ROSA, D. Importance of the sporotrichosis asteroid body for the rapid diagnosis of sporotrichosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 22, n. 3, p. 147-150, 2005.

GOLD, J.A.W. et al. Sporotrichosis-associated hospitalizations, United States, 2000–2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 10, p. 1817, 2016.

GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Porto Alegre: Artmed.1821 p., 2010.

GOVENDER, N.P. et al. An outbreak of lymphocutaneous sporotrichosis among mine-workers in South Africa. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 9, p. e0004096, 2015.

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

GREMIÃO, I.D.F. et al. Advances and challenges in the management of feline sporotrichosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2022.

GREMIÃO, I.D.F. et al. Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006077, 2017.

GUAN, M. et al. Melanin of *Sporothrix globosa* affects the function of THP-1 macrophages and modulates the expression of TLR2 and TLR4. **Microbial Pathogenesis**, v. 159, p. 105158, 2021.

GUTIERREZ-GALHARDO, M.C. et al. Epidemiological aspects of sporotrichosis epidemic in Brazil. **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, n. 4, p. 238-245, 2015.

HARTMANN, M. et al. Twenty-four-hour intragastric pH profiles and pharmacokinetics following single and repeated oral administration of the proton pump inhibitor pantoprazole in comparison to omeprazole. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 10, n. 3, p. 359-366, 1996.

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.

HERNÁNDEZ-CASTRO, Rigoberto et al. Epidemiology of clinical sporotrichosis in the Americas in the last ten years. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 6, p. 588, 2022.

HOU, B. et al. Molecular cloning, characterization and differential expression of DRK1 in *Sporothrix schenckii*. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 31, n. 1, p. 99-104, 2013.

JOURDAN, J.P. et al. Drug repositioning: a brief overview. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 9, p. 1145-1151, 2020.

JUWAIED, A.A. et al. Role of Omeprazole as An Antifungal Agent. **Engineering and**

Technology Journal, v. 29, n. 2, 2011.

KANO, R. et al. Molecular typing of *Sporothrix schenckii* isolates from cats in Malaysia. **Mycoses**, v. 58, n. 4, p. 220-224, 2015.

KATZUNG, B.G.; VANDERAH, T.W. **Farmacologia básica e clínica**. Artmed Editora, 2022.

KIDD, S.E.; ABDOLRASOULI, A.; HAGEN, F. Fungal Nomenclature: Managing Change is the Name of the Game. In: **Open Forum Infectious Diseases**. US: Oxford University Press, 2023.

KUUMI, F. et al. Assessment of antifungal effect of omeprazole on *Candida albicans*. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**, v. 4, n. 3, p. 45-51, 2013.

KWON-CHUNG, K.J. Comparison of isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from fixed cutaneous lesions with isolates from other types of lesions. **Journal of Infectious Diseases**, v. 139, n. 4, p. 424-431, 1979.

LEE, Y. et al. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2020.

LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, p. 293-308, 2006.

LU, M. et al. Proton pump inhibitors act synergistically with fluconazole against resistant *Candida albicans*. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2020.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. On a mycosis observed in men and mice: Contribution to the knowledge of the so-called sporotrichosis. **Rev. Médica São Paulo**, v. 21, p. 443-450, 1907.

MACHADO, E. R.; DE OLIVEIRA, L. B.; CHAVES, P. L. G.; EDUARDO, A. M. L.; AXHCAR, L. C. G. Esporotricose: uma revisão sistemática da literatura. **Rev. Iniciação Científica e Extensão**, v. 2, n. Esp. 1, p. 45, 2019.

MADRID, H. et al. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 26, n. 3, p. 218-222, 2009.

MADRID, I.M. et al. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. **Microbes and infection**, v. 12, n. 2, p. 162-165, 2010.

MAHAJAN, V.K. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. **Dermatology research and practice**, v. 2014, 2014.

MARIAT, F. The Epidemiology of Sporotrichosis In: Wolstenholme GEW-Systemic. **Mycosis**. A. Churchill, Londres, 144-59. 1968.

MATOS, M.F.A. et al. 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, 2019.

- MINER J.R.P. et al. Gastric acid control with esomeprazole, lansoprazole, omeprazole, pantoprazole, and rabeprazole: a five-way crossover study. **The American journal of gastroenterology**, v. 98, n. 12, p. 2616-2620, 2003.
- MORRIS-JONES, R. et al. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. **Infection and immunity**, v. 71, n. 7, p. 4026-4033, 2003.
- MARTINEZ, L.R.; CASADEVALL, A.. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbial Biofilms**, p. 135-147, 2015.
- MATSUI, M.S. et al. Omeprazole, a gastric proton pump inhibitor, inhibits melanogenesis by blocking ATP7A trafficking. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 3, p. 834-841, 2015.
- NEGRINI, T.C. et al. Influence of TLR-2 in the immune response in the infection induced by fungus *Sporothrix schenckii*. **Immunological Investigations**, v. 43, n. 4, p. 370-390, 2014.
- OLIVEIRA, M.M.E. et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 2, p. 102-110, 2015.
- OLIVEIRA, M.M.E. et al. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia**, v. 172, p. 257-267, 2011.
- OROFINO-COSTA, R., et al. "Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics." **Anais brasileiros de dermatologia**, 92: 606-620, 2017.
- PARISI, D.; ADASME, M. F.; SVESHNIKOVA, A.; BOLZ, S. N.; MOREAU, Y.; SCHROEDER, M. Drug repositioning or target repositioning: A structural perspective of drug-target-indication relationship for available repurposed drugs. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, v. 18, p. 1043, 2020.
- RANG, R. et al. **Rang & dale farmacologia**. Elsevier Brasil, 2015.
- REDIGUIERI, B.C. et al. Clinical, epidemiological, and epizootic features of *Sporothrix brasiliensis* in Espírito Santo, Brazil. **Ecohealth**, v. 19, n. 1, p. 124-134, 2022.
- REMENTERIA, A. et al. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. **Rev Iberoam Micol**, v. 22, n. 1, p. 1-23, 2005.
- RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. **Fungal infection: diagnosis and management**. John Wiley & Sons, 2012.
- RIPPON, J.W. **Medical mycology; the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. 3a ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1988.
- 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 AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. Feline sporotrichosis. In: Seyedmousavi S, de Hoog GS, Guillot J, Verweij PE, editors. **Emerging and epizootic fungal infections in animals**. Springer. p. 199–231. 2018.
- RODRIGUES A.M.; FERNANDES G.F.; DE CAMARGO Z.P. Sporotrichosis. In: Bayry J, editor. **Emerging and re-emerging infectious diseases of livestock**. Berlin: **Springer**. p. 391–421. 2017.
- RODRIGUES, A.M.; OROFINO-COSTA, R.; DE CAMARGO, Z.P. *Sporothrix* spp. In **Pocket Guide to Mycological Diagnosis**, 1st ed.; Cordeiro Rde, A., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2019; pp. 99–113.
- RODRIGUES, A.M.; DE HOOG, G.S.; DE CAMARGO, Z.P. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 12, p. e0004190, 2015.
- RODRIGUES, A.M. et al. Current progress on epidemiology, diagnosis, and treatment of sporotrichosis and their future trends. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 8, p. 776, 2022.
- RODRIGUES, A.M.; DE HOOG, S.; DE CAMARGO, Z.P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, p. 405-412, 2013.
- RODRIGUES, A.M.; HAGEN, F.; DE CAMARGO, Z.P. A spotlight on *Sporothrix* and sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 187, n. 4, p. 407-411, 2022.
- RODRIGUES, A.M.; DELLA TERRA, P.P.; GREMIÃO, I.D.; PEREIRA, S.A.; OROFINO-COSTA, R.; DE CAMARGO, Z.P. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, v. 185, n. 5, p. 813–842, 2020.
- RODRIGUEZ-CABAN, J. et al. Calcium/calmodulin kinase1 and its relation to thermotolerance and HSP90 in *Sporothrix schenckii*: an RNAi and yeast two-hybrid study. **BMC microbiology**, v. 11, p. 1-16, 2011.
- ROMERO-MARTINEZ, R. et al. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 6, p. 3696-3703, 2000.
- RUDRAMURTHY, S.M. et al. Phenotypic and molecular characterisation of *Sporothrix globosa* of diverse origin from India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 91-100, 2021.
- SÁNCHEZ-HERRERA, R. et al. Analysis of biofilm formation by *Sporothrix schenckii*. **Medical Mycology**, v. 59, n. 1, p. 31-40, 2021.
- SÁNCHEZ-HERRERA, R. et al. Biofilm formation in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*: development, architecture and biochemical characteristics. **Acta Universitaria.**, v. 24, p. 11-15, 2014.
- SCHAUER, A. et al. Spotting sporotrichosis skin infection: The first Australian paediatric case series. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 56, n. 3, p. 408-410, 2020.

SCHWARZ, J. The diagnosis of deep mycoses by morphologic methods. **Human Pathology**, v. 13, n. 6, p. 519-533, 1982.

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

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2004.

SINGH, V. et al. Inhibition of biofilm formation by esomeprazole in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 8, p. 4360-4364, 2012.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 791, 2015.

SHARMA, B.; SHARMA, A.K.; SHARMA, U.. Sporotrichosis: A comprehensive review on recent drug-based therapeutics and management. **Current Dermatology Reports**, v. 11, n. 2, p. 110-119, 2022.

SMITH, D.F.Q.; CASADEVALL, A. The role of melanin in fungal pathogenesis for animal hosts. **Fungal Physiology and Immunopathogenesis**, p. 1-30, 2019.

SMITH, M.T.; BATENBURG-VAN D.V., W. H. Ultrastructure of septa in *Blastobotrys* and *Sporothrix*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 51, n. 1, p. 121–128, 1985.

TABORDA, C.P. et al. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Mycopathologia**, v. 165, p. 331-339, 2008.

TAMEZ-CASTRELLÓN, A. K.; ROMEO, O.; GARCÍA-CARNERO, L. C.; LOZOYAPÉREZ, N. E.; MORA-MONTES, H. M. Virulence Factors in *Sporothrix schenckii*, One of the Causative Agents of Sporotrichosis. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 21, n. 3, p. 295– 312, 2020.

TSUTSUI, N. et al. A novel action of the proton pump inhibitor rabeprazole and its thioether derivative against the motility of *Helicobacter pylori*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 11, p. 3069-3073, 2000.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394-3400, 2002.

WALLER, S.B. et al. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 73-80, 2021.

WHITE, M.; PHAN, C.; ERDAG, G.; TOTTEN, M.; LEE, R.; LU, X.; MEHTA, S.; MILLER, L. S.; ZHANG, S. X. **Disseminated sporotrichosis following iatrogenic immunosuppression for suspected pyoderma gangrenosum**. *Lancet Infect. Dis.*, 2019.

WIDAL, F.; AERAMI, P.; JOLTRAIN, E.; BRISSAUD, E.T.; WEILL, A. Serodiagnostic mycosique, applications au diagnostic de la sporotrichoses et de l'actinomyose. **Les coagulations et cofixations mycosiques**. Ann. Inst. Pasteur. 1910.

XIROS, C.; STUDER, M. H. A multispecies fungal biofilm approach to enhance the cellulolytic efficiency of membrane reactors for consolidated bioprocessing of plant biomass. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 1930, 2017.

ZHANG, Y.Q. et al. Sporotrichosis: clinical and histopathological manifestations. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 33, n. 3, p. 296-302, 2011.

ANEXO A: Artigo submetido para a revista Mycopathologia (ID: MYCO-D-23-00115)

Mycopathologia

Effect of proton pump inhibitors on sensibility and melanogenesis of *Sporothrix* spp --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Effect of proton pump inhibitors on sensibility and melanogenesis of <i>Sporothrix</i> spp
Article Type:	Original Article
Keywords:	Sporotrichosis; Biofilms; Melanin; Omeprazole; Rabeprazole; Mycology
Corresponding Author:	Raimunda Samia Brilhante, Phd Universidade Federal do Ceara Fortaleza - CE, BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Ceara
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Raimunda Samia Brilhante, Phd
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Raimunda Samia Brilhante, Phd
	Augusto Nobre
	Anderson Costa
	Mirele Fernandes
	Alanna Sousa
	Maria Rocha
	Waldemiro Pereira-Neto
	Anderson Rodrigues
	Zoilo Camargo
	Marcos Rocha
	Jose Sidrim