

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DE *Acanthamoeba castellanii* SOBRE O
FUNGO *Trichophyton rubrum***

LUCAS VIEIRA DE FARIA

Belo Horizonte, MG

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

LUCAS VIEIRA DE FARIA

Estudo da interação de *Acanthamoeba castellanii* sobre o fungo
Trichophyton rubrum

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas com ênfase em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Assis dos Santos
(Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG)

Co-orientadora: Marliete Carvalho da Costa
(Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG)

Belo Horizonte, MG

2019

043 Faria, Lucas Vieira de.

Estudo da interação de *Acanthamoeba castellanii* sobre o fungo *Trichophyton rubrum* [manuscrito] / Lucas Vieira de Faria. – 2019.

97 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Assis dos Santos. Co-orientadora: Marliete Carvalho da Costa.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Amoeba. 3. Arthrodermataceae. 4. Fagocitose. 5. Tinha. I. Santos, Daniel de Assis dos. II. Costa, Marliete Carvalho da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DOUTORADO
Nº REGISTRO:

Às 13:30 horas do dia 22 de maio de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Susana Johann; Nalu Teixeira de Aguiar Peres; Estefânia Mara do Nascimento Martins; Rachel Basques Caligorne; Marliete Carvalho da Costa (Coorientadora) e o Prof. Daniel de Assis Santos - Orientador, para julgar a defesa de tese "Estudo da interação de *Acanthamoeba castellanii* sobre o fungo *Trichophyton rubrum*", do aluno Lucas Vieira de Faria, requisito para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de maio de 2019.

Dra. Susana Johann _____

Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres _____

Dra. Estefânia Mara do Nascimento Martins _____

Dra. Rachel Basques Caligorne _____

Dra. Marliete Carvalho da Costa (Coorientadora) _____

Prof. Daniel de Assis Santos (Orientador) _____

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

A Deus;

Aos meus pais, Rosilene e Ronaldo;

À minha irmã, Júlia;

**Aos amigos que fizeram parte desta jornada, em especial os amigos do
Laboratório de Micologia do ICB/UFMG;**

Dedico...

Agradecimentos

A Deus, por ter me dado força durante toda a caminhada; a Jesus Cristo por ter me abençoado com pessoas especiais que me auxiliaram durante a jornada e Maria Santíssima por ter aberto caminhos e corações sempre que precisei.

Aos meus pais, Ronaldo e Rosilene, minha irmã Júlia e a tia Silvia, pelo carinho, incentivo, amor e paciência. Vocês foram vitais para que isso tudo acontecesse. Amo vocês!

A todos os meus tios, tias, primos e primas, obrigado pelo carinho.

Às minhas avós, Vó Lia e Vó Linha, que mesmo de longe me observam e abençoam, assim como a Tia Meirinha, Tia Beth, Tio Ricardo, Hunter e meus avôs.

À minha família de BH: Paulo, Nicole, João Carlos, Carlos, Tiago, Mário, Rafael, Camila, Melina, Patrícia, Paulo Boratto, João Paulo, Leo, Gui, Poli, Anunciada, Maurício, obrigado por terem tornado esse tempo suportável, por todas as risadas, por todas as palavras, por estarem sempre por perto e por me aguentarem. Amo vocês.

Aos amigos do Laboratório de Micologia do ICB/UFMG, muito obrigado pela amizade, por todo apoio e ajuda que vocês dispuseram para comigo.

Aos amigos da Pós-graduação em Microbiologia da UFMG. Obrigado pelas conversas e brincadeiras.

Aos secretários do programa, Tiago e Debora. Obrigado pelo serviço e risadas.

Aos amigos de longas datas (Tiago, Hercílio, Caio, Pascoal, Gabriel, Bruno, Pedro, Gui Braz, João Paulo, Mateus Totonho, Mateus Castro, Bruno Dancing, Helder), que acompanham minha evolução pessoal e profissional, obrigado por se manterem ao meu lado, apoiarem e incentivarem todo esforço.

À minha co-orientadora, Dra. Marliete Carvalho da Costa, obrigado por toda ajuda, tempo, paciência e amizade. Você é uma pessoa de luz.

Ao meu orientador, Dr. Daniel de Assis dos Santos, obrigado por ter me dado a oportunidade e acreditado em mim apesar de todos os pesares. A sua humanidade e atenção sobressalta aos olhos. Obrigado por tudo.

À UFMG e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG, pela oportunidade, em especial o Professor Flávio.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento.

O meu mais sincero obrigado!

“Combati o bom combate, completei a corrida, guardei a fé!”

(II Timóteo 4:7)

RESUMO

Dermatofitoses são infecções fúngicas que afetam humanos e animais. Dentre os agentes etiológicos mais prevalentes nessas infecções está presente a espécie *Trichophyton rubrum*. As amebas do gênero *Acanthamoeba* apresentam ampla distribuição ambiental, se alimentando de bactérias, fungos, vírus presentes no ambiente. Ambos os microrganismos podem conviver em um mesmo ambiente, sendo assim o objetivo desse trabalho foi avaliar a interação de *A. castellanii* sobre *T. rubrum* em diferentes condições (PYG, NA e ND). Para tanto, foi estudada a cinética de encistamento de *A. castellanii* na presença e na ausência de *T. rubrum*, além de ensaio de fagocitose para confirmar a interação ameba-fungo, avaliar a influência de diferentes condições nutricionais (meios PYG, NEFF). Os resultados demonstram um encistamento da ameba de aproximadamente 30% com presença de *T. rubrum* e 25% sem o fungo, e a interação foi confirmada por fagocitose, onde na condição NA (adição de NEFF antes da infecção pelo fungo) há uma maior internalização na primeira hora, decaindo com o tempo. Foi realizado também a adição ou subtração de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , adição de manose e citocalasina D na fagocitose, atividade fungicida e liberação do fungo do interior da ameba. Os íons demonstraram-se importantes para a predação do fungo pela ameba e citocalasina D demonstrou a importância da actina no processo de liberação dos conídios, visto que houve uma diminuição na exocitose dos conídios. A manose diminuiu a fagocitose em PYG de forma dependente da concentração, não ocorrendo mesmo para NA. NA propiciou uma maior recuperação do fungo no interior da ameba e também uma menor liberação, concomitante a uma reduzida produção de espécies oxidativas, tendo também maior número de hifas no interior. Foram avaliadas também produção de espécies oxidativas, capacidade da ameba em inativar o fungo e a capacidade deste de sobreviver e ser liberado da ameba, e a produção de enzimas antioxidantes pelo fungo. O fungo recuperado da ameba foi testado frente ao itraconazol, cetoconazol e terbinafina, a fim de determinar a concentração inibitória mínima (CIM) destes antifúngicos. A presença de enzimas do complexo antioxidante demonstrou-se maior nas condições com passagens pela ameba do que o controle, mostrando uma adaptação para sobrevivência do fungo. A CIM de itraconazol apresentou variação significantes em PYG 1h e NA 24h e os demais antifúngicos não apresentaram alterações significativas. Assim, a ameba internaliza o fungo, independente da condição nutricional e esta internalização decresce com o tempo, sendo que esta predação pode ser aumentada na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} . Por outro lado, a ameba internaliza *T. rubrum* por mecanismo dependente de manose em trofozóitos e não em cistos e *A. castellanii* produz ROS e PRN que influenciam a sua atividade fungicida, que é independente de manose e o fungo produz enzimas do complexo antioxidante para sobreviver no interior da ameba.

Palavras-chave: Amebas; dermatófitos; fagocitose; dermatofitoses; tineas.

ABSTRACT

Dermatophytoses are fungal infections that affect humans and animals. Among the most prevalent etiological agents in these infections are the *Trichophyton rubrum* species. The amoebas of the genus *Acanthamoeba* present wide environmental distribution, feeding on bacteria, fungi, viruses present in the environment. Both microorganisms can live in the same environment, so the objective of this work was to evaluate the interaction of *A. castellanii* on *T. rubrum* in different conditions (PYG, NA and ND). The kinetics of *A. castellanii* in the presence and absence of *T. rubrum* were studied, as well as the phagocytosis assay to confirm the amoeba-fungus interaction, to evaluate the influence of different nutritional conditions (PYG media, NEFF). The results show an amoeba encroachment of approximately 30% with presence of *T. rubrum* and 25% without the fungus, and the interaction was confirmed by phagocytosis, where in the NA condition (addition of NEFF prior to fungus infection) there is a greater internalization in addition, the addition or subtraction of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions, addition of mannose and cytochalasin D in phagocytosis, fungicide activity and release of the fungus from the amoeba interior were performed. The ions proved to be important for the predation of the fungus by amoeba and cytochalasin D demonstrated the importance of actin in the conidial release process, since there was a decrease in the exocytosis of conidia. Mannose decreased phagocytosis in PYG in a concentration-dependent manner, not occurring even for NA. NA provided a greater recovery of the fungus inside the amoeba and also a lower release, concomitant to a reduced production of oxidative species, also having a greater number of hyphae in the interior. The production of oxidative species, the capacity of amoeba to inactivate the fungus and its ability to survive and be released from the amoeba, and the production of antioxidant enzymes by the fungus were also evaluated. The fungus recovered from amoeba was tested against itraconazole, ketoconazole and terbinafine in order to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of these antifungals. The presence of enzymes of the antioxidant complex was shown to be greater in the conditions with passages through the amoeba than the control, showing an adaptation for survival of the fungus. The MIC of itraconazole presented significant variation in PYG 1h and NA 24h and the other antifungal drugs did not show significant alterations. Thus, the amoeba internalizes the fungus, independent of the nutritional condition and this internalization decreases over time, and this predation can be increased in the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions. On the other hand, the amoeba internalizes *T. rubrum* by mannose-dependent mechanism in trophozoites and not in cysts and *A. castellanii* produces ROS and PRN that influence its fungicidal activity, which is independent of mannose and the fungus produces enzymes of the antioxidant complex for survive within the amoeba.

Keywords: Amoebas; dermatophytes; phagocytosis, dermatophytosis, tinea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho experimental proposto para resolução dos objetivos do trabalho.....	34
Figura 2 – Condições experimentais.....	36
Figura 3 – A presença de <i>Tr</i> induz encistamento em <i>Alx</i>	45
Figura 4 – Influência da condição PYG na interação entre <i>Tr</i> e <i>Alx</i>	46
Figura 5 - Micrografia em 100x do ensaio de fagocitose com <i>A. castellanii</i> desafiada por <i>T. rubrum</i> na condição PYG.....	48
Figura 6 – Sucessivas passagens de <i>Tr</i> por <i>Alx</i> alteram sua capacidade antioxidante.....	49
Figura 7 – Ensaio de fagocitose, atividade fungicida e liberação nas condições PYG e PYG com adição de 1mM de manose.....	50
Figura 8 – Micrografia em 100x do ensaio de fagocitose com <i>A. castellanii</i> desafiada por <i>T. rubrum</i> e gráfico de germinação de PYG com presença de manose.....	52
Figura 9 –Ensaio de fagocitose e liberação na presença de Citocalasina D 2 μ M.....	53
Figura 10 – Ensaio de fagocitose, atividade fungicida e liberação na condição PYG com adição dos íons divalentes Ca e Mg.....	54
Figura 11 – Influência da condição NA na interação entre <i>Tr</i> e <i>Alx</i>	55
Figura 12 - Micrografia em 100x do ensaio de fagocitose com <i>A. castellanii</i> desafiada por <i>T. rubrum</i> na condição NA.....	57
Figura 13 – Ensaio de fagocitose, atividade fungicida e liberação nas condições NA e NA com adição de 1mM de manose.....	58

Figura 14 – Micrografia em 100x do ensaio de fagocitose com <i>A. castellanii</i> desafiada por <i>T. rubrum</i> e gráfico de germinação de NA com presença de manose.....	60
Figura 15 – Ensaio de fagocitose, atividade fungicida e liberação na condição NA com ausência dos íons divalentes Ca e Mg.....	61
Figura 16 -Influência da condição ND na interação entre <i>Tr</i> e <i>Alx</i>	62
Figura 17 – Micrografia em 100x do ensaio de fagocitose com <i>A. castellanii</i> desafiada por <i>T. rubrum</i> na condição ND.....	64
Figura 18 – Ensaio de fagocitose, atividade fungicida e liberação nas condições ND e ND com adição de 1mM de manose.....	65
Figura 19 – Micrografia em 100x do ensaio de fagocitose com <i>A. castellanii</i> desafiada por <i>T. rubrum</i> e gráfico de germinação de ND com presença de manose.....	66
Figura 20 – Ensaio de fagocitose, atividade fungicida e liberação na condição ND com ausência de dos íons divalentes Ca e Mg.....	67
Figura 21 – Sumário de resultados.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – CIM do fungo <i>T. rubrum</i>	68
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alx – *Acanthamoeba castellanii* ALX

AVL – Amebas de vida Livre

BDA – Batata Dextrose Ágar

CFM – Concentração fungicida mínima

CIF – Concentração inibitória fracionário

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CTZ - Cetoconazol

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

IA – Infecção antes de adição de salina Neff

IPR – Índice de proliferação intracelular

ITZ – Itraconazol

J774 – macrófagos imortalizados derivados de camundongos Balb/c

MBP – *Mannose binding protein*

NA – condição com salina Neff adicionado antes da infecção

ND – condição com salina de Neff adicionada após a infecção

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Phosphate Buffered Saline

PYG – Peptone, Yeast extract, Glucose

SFB – Soro fetal bovino

SN – Sem Neff

TERB - Terbinafina

Tr – *Trichophyton rubrum* ATCC 28189

UFC – Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1	Introdução	11
1.1	Dermatófitos e dermatofitoses	11
1.2	Formas de transmissão e presença de dermatófitos no ambiente.....	14
1.3	<i>Trichophyton rubrum</i>	17
1.4	Patogenia e mecanismos de virulência de dermatofitos.....	19
1.5	Amebas de vida livre.....	23
1.6	O gênero <i>Acanthamoeba</i>	23
1.7	Interação ameba - fungos	27
2	Justificativa.....	31
3	Objetivos.....	32
3.1	Objetivo geral.....	32
3.2	Objetivos específicos.....	32
4	Metodologia.....	33
4.1	Microrganismos.....	33
4.2	Cultivo e manutenção de microrganismos.....	33
4.3	Desenho experimental.....	34
4.4	Avaliação da influência das condições experimentais no encistamento da ameba.....	36
4.5	Ensaio de fagocitose.....	37
4.6	Avaliação da influência do encistamento da ameba na fagocitose de conídios de dermatofitos.....	37
4.7	Avaliação da influência dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} na interação entre <i>T. rubrum</i> e <i>A. castellanii</i>	38
4.8	Avaliação da influência de manose na interação entre <i>T. rubrum</i> e <i>A. castellanii</i>	39
4.9	Ensaio de atividade fungicida e liberação do fungo do interior da ameba.....	39
4.10	Ensaio com citocalasina D.....	40
4.11	Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs).....	41
4.12	Ensaio de peroxidação lipídica.....	42
4.13	Enzimas antioxidantes.....	42

4.13.1	Atividade de superóxido dismutase (SOD).....	43
4.13.2	Atividade peroxidase (PER).....	43
4.14	Teste de microdiluição em placa.....	43
4.15	Análise estatística.....	44
5	Resultados.....	45
5.1	O metabolismo de <i>Alx</i> influencia na interação com <i>Tr</i>	45
5.2	Influência da condição PYG na interação entre <i>Tr</i> e <i>Alx</i>	46
5.3	Influência da condição NA na interação entre <i>Tr</i> e <i>Alx</i>	55
5.4	Influência da condição NA na interação entre <i>Tr</i> e <i>Alx</i>	62
5.5	Teste de sensibilidade a antifúngicos.....	68
6	Discussão.....	69
7	Sumário de resultados.....	75
8	Conclusões.....	75
	Referencias	76
	Atividades desenvolvidas.....	92

1 Introdução

1.1 Dermatofitos e Dermatofitoses

As dermatofitoses são dermatomicoses, conhecidas como *tineas*, e são causadas por um grupo específico de fungos abrangendo os gêneros *Microsporium*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (PIRES *et al.*, 2014). As espécies de fungos do gênero *Trichophyton* apresentam ampla distribuição global, sendo que *Trichophyton rubrum* é considerado o agente etiológico mais comum de dermatofitoses. *T. rubrum* pode apresentar, morfológicamente, hifas hialinas, micro e macroconídios, podendo apresentar também clamidoconídios e arthroconídios. Tais componentes podem estar envolvidos na infecção causada por esse fungo, sendo que os arthroconídios representam a principal estrutura infecciosa para seres humanos (ALY, 1994; BALTAZAR & SANTOS, 2015). *T. rubrum* é um fungo antropofílico, que pode infectar pés, tronco e unhas. As lesões causadas por este fungo apresentam uma característica clássica, com um clareamento no centro, cercado por uma borda vermelha elevada e escamosa. Apesar de bastante comuns, as infecções por *T. rubrum* podem ser de difícil diagnóstico por poderem apresentar morfologia atípica devido ao uso de esteroides sistêmicos ou tópicos e outros agentes imunossupressores (BUCKART, 1981; TAN *et al.*, 2013).

As infecções causadas pelos dermatofitos ocorrem em tecidos queratinizados, como pele, unhas e cabelo, sendo geralmente superficiais, afetando principalmente hospedeiros imunocomprometidos (SOUSA *et al.*, 2015). Esses fungos de pele, geralmente estão associados a algumas doenças bastante comuns, como caspa, dermatite atópica / eczema, pé de atleta e infecções nas unhas (onicomicose) (WHITE *et al.*, 2014). A grande maioria dos dermatofitos são encontrados em todo o mundo, entretanto, algumas espécies apresentam uma distribuição geográfica mais restrita e específica, como por exemplo *Trichophyton soudanense*, na África Central e Ocidental e *Trichophyton concentricum* nas Ilhas do Pacífico, Sudeste Asiático e América do Sul. Sendo assim, as infecções dermatofíticas são encontradas ubiquamente, porém a prevalência relativa das dermatofitoses causadas por diferentes dermatofitos pode variar em diferentes regiões (SEGAL & FRENKEL, 2015).

Dependendo do agente causal e da resposta imune do hospedeiro, as manifestações clínicas podem variar; durando de alguns meses a até mesmo anos, podendo ser assintomáticas ou manifestando-se apenas como prurido. Em diversos casos, porém, a infecção se manifesta como bolhas, fissuras, escamas ou manchas. Alguns sinais clínicos predominam dependendo do sítio afetado. Tais manifestações incluem: lesões no couro cabeludo, lesões espalhadas pelo corpo, lesões nos espaços interdigitais e regiões plantares do pé e lesões de unhas, podendo, em imunocomprometidos, causar granulomas. (PIRES *et al.*, 2014). As lesões dermatofíticas demonstram, microscopicamente, padrões variados, que vão desde uma lesão não inflamatória, provenientes de uma discreta reação em associação com esporos ou hifas nos folículos dos pelos ou no estrato córneo, até uma acentuada reação inflamatória, sem evidência de elementos fúngicos (JUNGERMAN & SCHWARTZMAN, 1972; HAYETTE & SCHAEELI, 2015; MORIELLO *et al.*, 2017).

Os dermatófitos podem ser distribuídos em três grupos com relação ao habitat onde são encontrados: os geofílicos, os zoofílicos e os antropofílicos. Os dermatófitos geofílicos encontram-se presentes no solo decompondo detritos queratínicos de animais mortos, por exemplo penas, peles e unhas (SEGAL & FRENKEL, 2015). De acordo com Hayette & Sacheli (2015), os dermatófitos zoofílicos e antropofílicos evoluíram de um dermatófito origem geofílica, sendo os dermatófitos antropofílicos o grupo mais especializado. O dermatófito geofílico mais comum que infecta cães e gatos é o *Microsporum gypseum*.

Os representantes do grupo zoofílicos parasitam principalmente animais (macacos, cavalos, cães, ovinos, gado, roedores e gatos). Alguns dermatófitos zoofílicos estão adaptados a viver em animais silvestres, como roedores e ouriços. Os exemplos mais comuns de tais dermatófitos são *T. mentagrophytes*, *T. mentagrophytes erinacei* (em roedores) e na Europa *M. persicolor* (MANCIANTI *et al.*, 2003; OUTERBRIDGE *et al.*, 2006). Crianças também são acometidas por infecções dermatofíticas através de contatos com animais infectados, sendo que estes podem ser assintomáticos (SEGAL & FRENKEL, 2015)

Os dermatófitos do grupo antropofílico são responsáveis por grande parte das infecções fúngicas de pele. Sua transmissão se dá por contato direto ou por exposição a células descamadas. A inoculação direta através de fissuras na pele ocorre mais frequentemente em pessoas imunodeprimidas. Uma vez que os fungos entram na pele, eles germinam e invadem as camadas superficiais da pele (HAINER, 2003). As espécies que mais causam infecções nesse grupo são: *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e *Epidermophyton floccosum* (SEGAL & FRENKEL, 2015). Tais agentes fúngicos estão, na prática clínica, comumente relacionados a problemas de saúde pública, causando micoses superficiais, cutâneas, oportunistas e sistêmicas (HARVEY, CHAMPE, FISHER, 2008).

Os dermatófitos causam doenças em humanos e em animais, sendo que as dermatofitoses são apontadas como as infecções fúngicas em humanos mais comuns no mundo além de que os dermatófitos podem colonizar 30 – 70% dos humanos sem causar doenças. (ACHTERMAN *et al.*, 2011; WHITE *et al.*, 2014). *Tinea capitis* é a dermatofitose mais comum em crianças, manifestando-se por meio de uma infecção no couro cabeludo e nos fios de cabelo. A transmissão pode ocorrer também por meio de chapéus, escovas, fronhas e outros objetos inanimados contaminados (HAINER, 2003; GUPTA *et al.*, 2005). *Tinea corporis* se apresenta geralmente como lesões descamativas anulares simples ou múltiplas, com centro mais claro, bordas elevadas, avermelhadas e margem acentuada (transição abrupta da pele afetada para a pele normal) no tronco ou na face, podendo ou não ser pruriginosa (ROSEN, 1997; HAINER, 2003). *Tinea pedis*, também conhecida como “pé-de-atleta”, é uma infecção superficial da pele dos pés e dos dedos. É uma das formas mais comuns de dermatofitose. Apresenta três formas mais comuns: 1) a forma interdigital (mais comum) é caracterizada por fissuras, maceração e descamação nos espaços interdigitais do quarto e quinto dedo, causada principalmente por *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (BROKKS & BENDER, 1997; HAINER, 2003, GUPTA *et al.*, 2005; ILKIT & DURDU, 2015). A *tinea cruris* é uma infecção dermatofítica que ocorre na região da virilha, sendo mais comum em indivíduos do sexo masculino e ocorre quando a temperatura ambiente e umidade são altas. O uso de roupas molhadas ou apertadas

fornece um ambiente ideal para infecção (ZUBER & BADDAM, 2001; HAINER, 2003).

Onicomicose é uma infecção fúngica das unhas dos pés ou das mãos, afetando mais as unhas dos pés, devido ao fato de crescerem mais vagorosamente, suprimento de sangue reduzido, confinamentos escuros e ambientes úmidos. Ela causa descoloração, espessamento e separação do leito ungueal. Ocorre em aproximadamente 10% da população mundial, sendo mais comum em adultos mais velhos, sendo que há uma prevalência de 20% em pessoas com mais de 60 anos e 50% em pessoas com mais de 70 anos. Aproximadamente 90% dos casos reportados de onicomicose são devidos a dermatófitos, em especial à *T. rubrum* e *T. interdigitale* (HAINER, 2003, GUPTA et al., 2001; GUPTA et al., 2005).

1.2 Formas de transmissão e presença de dermatófitos no ambiente

Uma fonte de transmissão bastante comum é o banheiro de uma casa familiar, onde um membro infectado pode passar para os demais. Além de, com a evolução de um estilo de vida mais esportivo, locais como piscinas públicas, academias de musculação e de artes marciais também podem ser fontes de transmissão (PIRES et al., 2014; HAYETTE & SACHELI, 2015; REAZEI- MATEHKOLAEI et al., 2018).

Fazendeiros e agricultores são profissões de grande exposição ao ambiente, incluindo contato com animais de fazenda e solo. *T. mentagrophytes* e *M. canis*, dermatófitos associados a animais de estimação, também estão associados à infecção em fazendeiros, devido a gatos e cães encontrados em fazendas. Além disso, *T. verrucosum*, um dermatófito zoofílico relacionado à infecção em bovinos, principalmente em bezerros jovens, pode infectar humanos que entram em contato com gado infectado (AGHAMIRIAN & GHASIAN, 2011; SEGAL & FRENKEL, 2015).

Spiewak & Szostak (2000), estudaram a frequência de infecções causadas por dermatófitos em agricultores e não-agricultores na Polônia Oriental. Com um N de 116 agricultores e 74 não-agricultores, dos quais 55,2% e 47,3%,

respectivamente, foram diagnosticados com alguma infecção por dermatófito. Os dermatófitos do grupo antropofílicos representaram 52,6% e 40,5%, respectivamente, dos agentes causadores da infecção (*T. rubrum* 36 casos, *T. interdigitale* 18 casos, *E. floccosum* 15 casos, *T. tonsurans* e *T. violaceum* 2 casos cada). Com relação a dermatófitos zoofílicos e geofílicos, foram encontrados apenas em 4,3% dos agricultores (*T. verrucosum* 3 casos, *Trichophyton terrestrae* e *Microsporum gypseum* e 1 caso cada) e em 8,1% dos não agricultores (*M. canis* em 2 casos, e *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*, *M. nanum* e *T. terrestrae* e 1 caso cada), concluindo que seu estudo não revelava diferenças significativas entre a frequência de dermatófitos zoofílicos ou geofílicos em agricultores e em não agricultores.

As piscinas e suas instalações podem servir como um reservatório de fragmentos de pele de indivíduos infectados, quem podem transmitir a infecção. Fischer (1982) em seus estudos demonstrou que *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* podem sobreviver na água da piscina clorada na temperatura de 28 a 30 °C por até 123 dias. Detandt & Nolard (1995) em seus estudos, demonstraram que, pisos de piscinas sob condições subtropicais apresentavam contaminações por dermatófitos. Eles isolaram dos pisos os dermatófitos antropofílicos *T. interdigitale* e *T. rubrum*. Seebacher, Bouchara & Mignon (2008) relataram que casos de incidência de *Tinea pedis* eram significativamente maiores entre banhistas de piscinas públicas.

Anderson (1979) demonstrou que dermatófitos eram capazes de sobreviver na areia da praia e também na água do mar, mostrando *M. gypseum*, um fungo geofílico, *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes*, que podem causar doenças em humanos, conseguem sobreviver *in vitro* a água do mar e em areias de praia. Pereira *et al.* (2013), em estudos com areais das praias do arquipélago de Madeira (Portugal), demonstrou a presença de dermatófitos do gênero *Trichopyton*.

Seebacher, Bouchara & Mignon (2008) relataram uma incidência significativamente maior de *Tinea pedis* em mineiros e açougueiros. Eles explicam que esse fato pode se dar devido ao uso de botas de borracha, que são compartilhadas, além de banhos nos chuveiros comunitários do trabalho, o

que poderia ser uma fonte para a infecção. Cohen *et al.* (2005), realizaram um estudo sobre a prevalência de *tinea pedis* entre soldados israelenses, revelou uma prevalência clínica de 60%, associada principalmente ao gênero masculino e variando de acordo com o tipo de treinamento militar.

Burkhart, Chang & Gottwald (2003) relataram um caso de um paciente HIV positivo com erupções nas costas e abdômem causadas por *T. rubrum*. Foi então iniciado o tratamento com terbinafina oral (250 mg/dia). A infecção desapareceu após duas semanas. A frequência de dermatofitose epidérmica em HIV positivos não é significativamente maior do que em pacientes HIV negativos, entretanto a gravidade e variabilidade da infecção podem ser mais severas. A prevalência de infecção por dermatófito é de até 20% em pacientes HIV positivos com contagem de células T abaixo de 400 / mL (JOHNSON, 2000; BURKHART, CHANG & GOTTWALD, 2003).

Sadri *et al.* (2000), em seus estudos, definiram a quantidade de pacientes que tinham tanto *Tinea cruris* quanto *Tinea pedis* em Teerã (Iran). Eles obtiveram que, em um número de 60 pacientes avaliados (sendo 46 homens e 14 mulheres), o fungo mais comum foi *E. floccosum* para *Tinea cruris* e apenas quatro pacientes tinham *tinea pedis* em conjunto com *tinea cruris*, sendo que o único fungo isolado dos pés foi *T. mentagrophytes*.

Niita *et al.*, (2016), caracterizaram a frequência de infecção por dermatófitos e o potencial risco de contaminação para os proprietários e possíveis compradores de gatos persas aparentemente saudáveis em estabelecimentos comerciais de São Paulo, Brasil, utilizando um N de 61 gatos. Os autores relatam que, do estudo, 51 gatos (83.6%), foram positivos para crescimento fungico, sendo que apenas o dermatófito *Microsporum canis* foi isolado. Dos 18 humanos que tiveram contato com esses gatos positivos para crescimento fungico, 8 indivíduos (44,4%) tiveram lesões típicas de dermatofitoses (*tinea corporis*), demonstrando assim o potencial risco de infecção por gatos em gatos localizados na região metropolitana de São Paulo.

Silva-Rocha, Azevedo e Chaves (2016), avaliaram a epidemiologia e a distribuição de espécies fungicas causadores de micoses superficiais no

Nordeste do Brasil, no período de abril de 2013 à dezembro de 2014. As coletas foram realizadas em Natal (RN), com um N de 205 pacientes, com idades variando de 3 a 83 anos, sendo que 235 amostras clínicas foram obtidas. Das amostras coletadas, 113 foram positivas, sendo 73 do sexo feminino (64,6%) e 40 do sexo masculino (35,4%), sendo que o fungo dermatófito mais comum encontrado foi o *Trichophyton rubrum* (18,6%), seguido por *T. tonsurans* (13,3%).

Rocha *et al.*, (2018) avaliaram o perfil epidemiológico de micoses cutâneas superficiais no Sul do Brasil, com amostras de unidades de básicas de saúde (UBS) da região metropolitana e do interior do estado de Rio Grande do Sul (RS), do período de janeiro de 2012 a novembro de 2016, com 5304 amostras de pacientes analisadas. Dessas amostras analisadas, 1125 (21%) apresentaram-se positivas para micoses cutâneas superficiais, onde, desse total, *T. rubrum* foi isolado em 616 amostras (54,8%), além de *T. mentagrophytes* (8,5%), tendo maior incidência de onicomicoses entre os pacientes (68%).

1.3 *Trichophyton rubrum*

O fungo *Trichophyton rubrum* é um microrganismo que pertence ao reino Fungi; divisão Ascomycota; Subdivisão *Pezizomycotina*; Classe *Eurotiomycetes*; Ordem *Onygenales*; Família *Arthrodermataceae*; Subfamília *mitosporic Arthrodermataceae*; Gênero *Trichophyton*; Espécie *Trichophyton rubrum* (ELEWSKI, 1998). Quando cultivado em meio Sabouraud apresenta crescimento lento, apresentando colônias brancas com textura cotonosa e com reverso de coloração rubra. Apresenta, em relação as suas estruturas de reprodução assexuada, macroconídeos, em quantidade variada, longos, com parede fina e três a oito células e microconídeos com forma de clave. Os arthroconídeos exibem parede celular espessa, sendo mais resistentes, podendo manter-se viáveis por até 18 meses sob condições ambientais desfavoráveis (GRÄSER *et al.*, 2000; KERN & BLEVINS, 2004).

Trichophyton rubrum foi descrito primeiramente por Castellani em 1910, quando os outros principais dermatofitos já haviam sido conhecidos por décadas. No final do século 19, essas doenças foram apontadas como a causa crônica de *tinea corporis*, e, desde então tem sido espalhada pelo mundo como agentes etiológicos de onicomicoses e *tinea pedis* (BAER *et al.*, 1955; GRÄSER *et al.*, 2000). Com origem na África Ocidental, Sudeste Asiático, Indonésia e Norte da Austrália, o *T. rubrum* se espalhou pela Europa e América do Norte e do Sul no final do século 19 e início do século 20, onde encontrou um nicho dentro de uma população recentemente calçada. Desenvolvimentos subsequentes do século XX, incluindo guerras, o movimento moderno de saúde e o uso associado de calçados oclusivos e vestiários, e a migração de pessoas desde a invenção do jato jumbo, promoveram um aumento na incidência de *tinea pedis* e onicomicose (CHARIF & ELEWSKI, 1997; ELEWSKI 1998).

Trichophyton rubrum é o fungo dermatófito com maior importância clínica, sendo o principal agente antropofílico de dermatofitoses, estando associado a infecções em unhas, e em menor número, casos de *tinea corporis* e *tinea pedis*, podendo ser isolado em até 80% de ocorrências relatadas por universitários, e é também responsável pelo maior número de casos de dermatofitoses crônicas e refratárias ao tratamento, devido ao fato de, por ser realizado tratamento com antifúngicos tópicos, após certa melhora aparente, indivíduos suspendem o medicamento, fazendo com que o fungo retorne (ZAITZ *et al.*, 1994; SIQUEIRA *et al.*, 2006; NENOFF *et al.*, 2013). Lee *et al.*, (2015), fizeram uma análise de 131.122 pacientes com dermatofitoses nos últimos 37 anos (1979 – 2013) na Coreia do Sul, e obtiveram um resultado que, desses 131.200 pacientes, 115.846 (88,3%) haviam tido infecção por *T. rubrum*. Estudo realizado por Vena *et al.*, (2012), onde foi comparado a incidência dermatofitoses de 2005 – 2010 no Serviço de Micologia da Clínica de Dermatologia do Hospital da Universidade de Bari (Itália), comparando com dados de 1975, demonstrou que *T. rubrum* teve um aumento progressivo no número de pacientes infectados, de 16,5% em 1975 para 64% no período de 2005 – 2010.

1.4 Patogenia e mecanismos de virulência de *T. rubrum*

O primeiro passo para uma infecção por dermatófitos ter início é a adesão de material infeccioso do fungo ao tecido hospedeiro queratinizado. A infecção geralmente é transmitida por meio de contato direto com os humanos ou animais infectados ou pelo contato indireto com os fomites contaminados. Ao entrar em contato com o hospedeiro, os dermatófitos passam por seu primeiro desafio, que são os mecanismos primários de defesa, como por exemplo: a pele e sua microbiota natural, exposição a luz ultravioleta e pH ácido e baixa umidade. A constante renovação do estrato córneo é também um mecanismo comum de defesa do hospedeiro, sendo que essa descamação pode fazer com que o patógeno seja removido antes de se estabelecer (WAGNER *et al.*, 1995). Em contrapartida o fungo responde com uma germinação acelerada dos seus arthroconídeos, sendo capaz assim de penetrar previamente a descamação (KAUFMAN *et al.*, 2007). Após a aderência, os esporos germinam e penetram nas células do estrato córneo para os sítios e nutrientes mais fortes, durante os quais os dermatófitos produzem uma variedade de fatores de virulência que incluem enzimas e não enzimas. Os fungos dermatófitos podem produzir uma gama de variadas enzimas, que podem desempenhar um papel como fatores de virulência, como queratinases, proteases, fosfolipases, lipases e elastases, em diferentes especificidades de substrato, que estão envolvidas na patogenicidade dos tecidos do hospedeiro (CHINNAPUN, 2015; ELAVARASHI, KINDO, RANGARAJAN, 2017).

Dermatófitos, assim como outras espécies de fungos, produzem diversas proteases, em meio contendo proteínas como única fonte de nitrogênio, para que haja degradação destas em aminoácidos e peptídeos curtos. Esses são então, assimilados e utilizados para nutrição do fungo (JOUSSON *et al.*, 2004; SRIRANGANADANE *et al.*, 2011). Dermatófitos secretam, em pH alcalino ou neutro, Sub3 e Sub4, que são duas subtilisinas principais, Mep3 e Mep4, importantes fungalisinas, que agem como endopeptidases. Também são secretadas aminopeptidases, incluindo leucinas aminopeptidases (Lap1 e Lap2) e dipetidil-peptidases (DppIV e DppV), que apresentam atividades

semelhantes a ortólogos de *A. fumigatus*. Descobriu-se também que dermatófitos secretam uma carboxipeptidase da subfamília MEROPS M14A, homóloga às carboxipeptidases pancreáticas humanas (JOUSSON *et al.*, 2004; MONOD *et al.*, 2005; SRIRANGANADANE *et al.*, 2011).

Em meio proteico com pH ácido, as enzimas secretadas por dermatófitos são diferentes, como proteases aspárticas da família das pepsinas (Pep1) como endoprotease, bem como exoproteases que são tripeptidil peptidases da família sedolisina (Seds) (SRIRANGANADANE *et al.*, 2011; GRÄSER *et al.*, 2018). De acordo com as proteases secretadas pelos dermatófitos, sugere-se mecanismos básicos de proteólise extracelular semelhantes aos descritos em espécies de *Aspergillus* em pH ácido e neutro. As endoproteases produzem grandes peptídeos com extremidades livres nas quais as exoproteases podem atuar gerando aminoácidos e peptídeos curtos (BYUN, KOFOD, BLINKOVSKY, 2001; GRÄSER *et al.*, 2018).

Os dermatófitos apresentam uma característica comum importante: a capacidade de utilizar a queratina como fonte de nutrientes. No entanto, essas proteases secretadas pelos dermatófitos, são incapazes de degradar a queratina por si só. Para que haja uma degradação eficiente da queratina por enzimas hidrolíticas, as queratinases necessitam de acompanhamento de uma redução simultânea de pontes de dissulfeto de cisteína, principais responsáveis pela natureza resistente da queratina. Dermatófitos excretam sulfito como agente redutor durante a degradação da queratina, sendo que, na presença de sulfito, as ligações dissulfeto do substrato da queratina são diretamente clivadas em cisteína e sulfocisteína, tornando a redução da queratina acessível por endo e exoproteases secretadas (KUNERT, 1992; LÉCHENNE *et al.*, 2007, GRÄSER *et al.*, 2018).

Análises de transcriptomas, realizados com RNA de cobaias infectadas por *Trichophyton benhamiae* e análises proteômicas de proteínas extraídas de leito ungueal de pacientes infectados com onicomicose revelaram que uma subtilisina em particular (Sub6 [um dos principais alérgenos de *T. rubrum*]) foi a principal protease secretada durante infecção. Genes codificadores desta protease e de outras que são concomitantemente secretadas durante a

infecção não foram detectadas *in vitro*, ao contrário, nenhum dos genes que codificam endo e exoproteases na digestão de queratina *in vitro* foi regulado positivamente durante a infecção (STAIB *et al.* 2010; TRAN *et al.*, 2016).

Existem outros fatores de virulência, além das enzimas de virulência dos dermatófitos. Mecanismos de patogênese de outros fungos foram utilizados para se prever alguns fatores de virulência dos fungos dermatófitos. Xantomegnina, uma micotoxina mutagênica, que é conhecida como um agente de nefropatia, podendo acarretar óbito em animais de criação expostos a fungos de origem alimentar, como *Penicillium* e *Aspergillus*, foi predita como um fator de virulência de *T. rubrum* durante a infecção humana, podendo ser extraída de unha humana e material da pele infectado por *T. rubrum*. Também foram identificados que a presença de melanina, ou compostos semelhantes à melanina dos dermatófitos, desempenha um papel na patogênese das doenças dermatofíticas na infecção de *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, com base no papel conhecido das melaninas em outros fungos patogênicos (GUPTA *et al.*, 2000; YOUNGCHIM *et al.*, 2011; CHINNAPUN, 2015).

Durante a infecção por dermatófitos, a resposta imune principal ocorre com a produção da resposta imune adaptativa do tipo Th1 com a produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL) -2 e interferon (IFN) γ . Tal resposta é induzida a fim controlar a infecção. Entre os multifatores capazes de regular a resposta imune estão inseridos os fatores de crescimento, interleucinas (IL-1, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8) e fatores estimuladores de colônias são secretados pelos queratinócitos. A interação de conídios de *T. rubrum* com macrófagos residentes resultam na produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α) e IL-10, mas não IL-12 e óxido nítrico, que regula negativamente a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD54) (VERMOUT *et al.*, 2008; MENDEZ-TOVAR, 2010; CHINNAPUN, 2015).

O papel dos queratinócitos é baseado em receptores de padrão de reconhecimento (PRRs), também é estabelecido que a ativação desses PRRs atua como uma ponte, induzindo respostas do sistema imune adaptativo. Dentre os PRRs, os mais bem estudados são os Receptores Toll-Like (TLRs).

Dentre os mais expressos por queratinócitos epidermais, na região tem-se localizado principalmente na superfície os receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6, e em endossomos TLR3 e TLR9 (NESTLE *et al.*, 2009; MEDHZITOV, 2010; GARCÍA-MADRID *et al.*, 2011). García-Madrid *et al.* (2011), demonstraram em seu estudo que a expressão de TLR2 e TLR6 diminuiu notavelmente quando os queratinócitos foram estimulados com conídios inteiros de *T. rubrum*. Já em contato com um homogenato dos conídios de *T. rubrum* demonstrou que conídios de *T. rubrum* inibiram TLR2 e TLR6, impedindo a ativação de respostas imunes, provavelmente para garantir a sobrevivência dos fungos. Em relação aos mecanismos inibidores da expressão de TLR2 e TLR6, existe a possibilidade de que esses receptores não sejam detectados por terem sido degradados por enzimas liberadas pelos fungos.

O estudo de Yuki *et al.* (2011), mostrou que há um aumento nas junções entre os queratinócitos quando há a ativação de TLR2, sendo um passo importante na manutenção das barreiras epidérmicas contra agentes infecciosos, como bactérias ou fungos. Também foi demonstrado que a inibição de TLR2 aumenta a permeabilidade da barreira cutânea, o que facilita a invasão fúngica, pois diminui a coesão entre os queratinócitos. Oliveira *et al.* (2015), em estudos sobre expressão de receptores TLR2 e 4 nos queratinócitos de pacientes com *T. rubrum*, demonstraram uma expressão reduzida de TLR4 na epiderme superior e inferior tanto nos casos com dermatofitose localizada, quanto disseminada, quando comparadas ao controle. Deste modo, como TLR4 induz produção de citocinas inflamatórias e recrutamento de neutrófilos, essa expressão reduzida provavelmente contribui para a não resolução da infecção e persistência da dermatofitose. Entretanto, foi observado que a expressão de TLR2 foi mantida em todos os grupos. Como a via de TLR2 é descrita como um fator de regulação de processo inflamatório e preservação da estrutura epidérmica, a expressão inalterada nas lesões dos pacientes pode também ter contribuído na persistência da infecção e no reduzido processo inflamatório, característico das infecções por dermatófitos.

1.5 Amebas de vida livre

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários oportunistas, ubíquos e amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados em solo, poeira, ar, água do mar, água potável, piscinas, esgoto, soluções de lavagem ocular, lentes de contato, unidades de diálise e unidades de tratamento dentário. A presença destas amebas nestes ambientes está, de modo geral, ligada à presença de outros micro-organismos, como fungos, bactérias e algas, porque são utilizados como fonte de alimento. Elas independem de um hospedeiro para sua transmissão e propagação, nem mesmo ocorre transmissão de hospedeiro para hospedeiro (ALVARENGA; FREITAS; HOFLING-LIMA, 2000; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004; TRABELSI *et al.*, 2012).

São denominadas anfitriônicas as amebas que são capazes de viver como organismos de vida livre e, eventualmente, endozoicamente (habitar em um hospedeiro causando danos). Os gêneros *Acanthamoeba*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* e a *Sappinia pedata* se encaixam como representantes deste grupo de amebas (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004; VISVESVARA *et al.*, 2007).

1.6 O gênero *Acanthamoeba*

O gênero *Acanthamoeba* foi estabelecido por Volkonsky em 1930, mas historicamente sua classificação criou uma certa confusão. Em 1930, Castellani encontrou a ameba em uma cultura do fungo *Cryptococcus pararoseus*, e primeiramente atribuiu ao gênero *Hartmannella*. Então, em 1931, Volkonsky sugeriu uma classificação por grupos com relação a sua morfologia: amebas com cistos redondos e parede lisa seriam do gênero *Hartmannella*; as com divisão celular no cisto do gênero *Glaeseria* e *Acanthamoeba* foram definidas como amebas que tinham hastes pontiagudas na mitose, cistos de parede dupla e uma camada externa irregular. Em seguida a sua descoberta, estes

microrganismos foram ignorados por quase três décadas, até que, em 1958, Culbertson, realizando testes de segurança da vacina de Poliomielite, verificou o potencial patogênico destes organismos pela primeira vez, demonstrando sua capacidade de produzir efeitos citopáticos *in vitro* em células renais de macaco, e a de matar animais de laboratório *in vivo* (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004; KHAN, 2006; LLOYD, 2014).

A taxonomia tradicional de *Acanthamoeba* utiliza-se de características morfológicas como morfologia dos cistos, seu tamanho e forma do trofozoito como características para sua identificação. *Acanthamoeba* são categorizadas em três grupos morfológicos (BOOTON *et al.*, 2005). Já análises moleculares do gene 18S rRNA identificaram 20 genótipos (T1 a T20) nesse gênero. Desses 18 genótipos, 8 são causadores de ceratite amebiana (T2, T3, T4, T5, T6, T10, T11 e T15) (ARNALICH-MONTIEL *et al.*, 2014; OMAÑA-MOLINA *et al.*, 2015). Dos 20 genótipos, T4 é o mais abundante no meio ambiente e inclui várias linhagens patogênicas associadas com doenças do olho e neurológicas (OMAÑA-MOLINA *et al.*, 2015).

Com relação ao gênero *Acanthamoeba*, sabe-se que são protozoários aeróbios, podendo ser encontrados nos mais variados ambientes e em todos os continentes (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003). O termo “acanth” (do grego “espinhos”) foi adicionado a “ameba”, indicando assim a presença de estruturas semelhantes a espinhos (os acantapódios) em sua superfície (SIDDIQUI & KHAN, 2012). As espécies pertencentes a tal gênero apresentam no seu ciclo de vida uma fase trofozoítica, ativa, que se alimenta e se reproduz; além de uma forma cística quando em condições adversas, como escassez de nutrientes, alteração de pH, temperatura e dessecação (PAGE, 1967; BOWERS & KORN, 1979). González-Robles *et al.* (2008), demonstraram em seu estudo que o citoesqueleto de *A. castellanii* é feito em grande parte de fibras e redes de actina, sendo estas encontradas principalmente em estruturas relacionadas a locomoção citoplasmática, como lamelipódios e também em estruturas endocíticas diversas. Em *Acanthamoeba* sp., a actina aparenta apresentar papel em funções relacionadas com adesão, motilidade, fagocitose e outros processos. O citoesqueleto rico em actina dos trofozoítos permite uma rápida mudança morfológica em resposta a estímulos exteriores (Gumbiner,

1996; GONZÁLEZ-ROBLES *et al.*, 2008). Estudos utilizando citocalasina D (um inibidor de polimerização de actina) tem demonstrado que na presença deste inibidor, a fagocitose é abolida (ALSAM *et al.*, 2005).

O ciclo de vida de *Acanthamoeba* é relativamente simples, apresentando duas fases: um trofozoíto vegetativo (fase ativa) e uma fase de cisto (mais resistente) (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004; KHAN, 2006;).

A fase trofozoítica (“trofo” do grego significa “nutrir”) de *Acanthamoeba* exhibe caracteristicamente a forma ameboide, medindo de 12 - 35 μm de comprimento e 780 μm^3 de volume, sendo que estas medidas variam de entre isolados e genótipos diferentes. É distinto nos trofozoítos a presença de diversos acantopódios (estruturas semelhantes a espinhos na sua superfície), que são finas expansões citoplasmáticas, de formato pontiagudo, que são importantes na adesão às superfícies, movimentos celulares ou na captura de presas. Apresentam, normalmente, um único núcleo, sendo que este tem aproximadamente um sexto do seu tamanho, com formato circular e nucléolo central pronunciado. *Acanthamoeba* se alimenta ativamente de bactérias, fungos, algas, leveduras ou pequenas partículas orgânicas por fagocitose e de matéria orgânica líquida por pinocitose e diversos vacúolos alimentares podem ser vistos em sua superfície. A divisão celular é assexuada e ocorre por fissão binária (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004; KHAN, 2006).

Em condições adversas (falta de nutrientes, aumento da osmolaridade ou hipo-osmolaridade, extremos de pH e temperatura), as amebas se diferenciam para o estágio de cistos. Em termos simples, o trofozoíto torna-se metabolicamente inativo (mínimo de atividade metabólica) e se torna mais resistente. Durante o estágio de preparação para formação de cisto, o excesso de nutrientes, água e material particulado é expulso e o trofozoíto se condensa em uma estrutura arredondada (o pré-cisto), que em seguida se amadurece em um cisto de parede dupla. Eles podem apresentar uma variada gama de formas, porém todos eles possuem uma série de aspectos que os caracterizam: apresentam um tamanho ligeiramente menor que os trofozoítos (entre 5 – 20 μm), contêm um só núcleo (com algumas exceções). Apresentam uma parede composta por dois envoltórios, um externo outro interno. O

envoltório mais interno adere-se próximo ao protoplasma, constituindo o endocisto, que pode ter forma poligonal, esférico ou estrelado. Os cistos estão presentes no ar, o que facilita sua dispersão no ambiente ou transporte para hospedeiros susceptíveis. Possuem poros, chamados ostíolos, que monitoram as mudanças ambientais e podem permanecer viáveis por anos. (WEISMAN, 1976; MAZUR *et al.*, 1995, KHAN, 2006).

Alguns íons podem favorecer a movimentação do citoesqueleto, como por exemplo, Ca^{2+} e Mg^{2+} . Wang, Asem e McLaughlin (1994) demonstraram que baixas concentrações de cálcio aumentam a adesão de *A. polyphaga* a matriz proteica extracelular. Fu e Casadevall (2018), demonstraram que a adição de Ca^{2+} e Mg^{2+} no meio potencializou a predação de *Cryptococcus neoformans* pela ameba, aumentando a fagocitose, mobilidade e área de superfície da ameba. Estes íons divalentes aparentam ter efeitos globais na função celular de *A. castellanii*, podendo funcionar de forma sinérgica para aumentar sua capacidade predatória. Uma área de superfície aumentada e maior mobilidade, provavelmente aumentam o contato da ameba com células predadas, aumentando a probabilidade de fagocitose. Embora ainda não se tenha a resposta exata de por que a presença desses íons afeta *A. castellanii*, há evidências de que eles têm efeitos poderosos sobre as amebas, como por exemplo na pinocitose e locomoção (STOCKEM & KLEIN, 1988). Tanto Ca^{2+} e Mg^{2+} desencadeiam vias de sinalização que aumentam a quimiotaxia em *Dictyostelium discoideum* (KOROHODA, MADEJA & SROKA, 2002) e em *Entamoeba invadens* a presença de Ca^{2+} é o gatilho para encistamento (MAKIOKA *et al.*, 2002).

Estudos laboratoriais têm utilizado diversos métodos para produzir cistos, como por exemplo a depleção de nutrientes, entre eles a salina de Neff (solução estoque 10X - NaCl – 1,20 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,04 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,04 g; Na_2HPO_4 – 1,42 g; KH_2PO_4 – 1,36 g; 100 mL dH_2O) é utilizado para tal fim (LLOYD, 2014; LORENZO-MORALES, KHAN, WALOCHNIK, 2015). De acordo com Neff *et al.* (1964), as células precisam de aproximadamente três horas para entrar no início da fase de encistamento (70% células). Ainda de acordo com os autores citados anteriormente, a presença de íons na composição do meio é importante, primeiro porque promovem uma tonicidade

adequada, e segundo, os cátions Mg^{++} e Ca^{++} são requeridos para o encistamento.

Davies, Chattings e Edwards (1991), demonstraram que *A. castellanii* possui um sistema de oxidase tipo explosão respiratória que é responsável pela captação estimulada de O_2 durante a fagocitose, levando a formação de O_2^- . Deste modo, foi demonstrado que a fagocitose em *A. castellanii* é semelhante a outros fagócitos, pois ocorre: (1) aumento da captação de O_2 durante a fagocitose; (2) conversão estequiométrica deste O_2 em O_2^- ; (3) uma relação direta entre o número de vesículas fagocíticas produzidas pela célula e a extensão da produção de oxidante; (4) possui um citocromo do tipo-b presente nas membranas do fagolisossomo.

As infecções atribuídas a *Acanthamoeba* normalmente ocorrem quando os trofozoítos ou cistos deste protozoário, presentes no ambiente, entram em contato com os olhos, feridas na pele ou pelo trato respiratório do hospedeiro, levando a um possível estabelecimento e proliferação da ameba no organismo (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003). As lectinas apresentam importante papel na patogenicidade e fisiopatologia de *Acanthamoeba*, sendo elas importantes na adesão das amebas com o hospedeiro. Entre elas, uma proteína de ligação à manose (MBP) mostrou ter forte potencial patogênico de *A. castellanii* quando correlacionada com as principais proteínas de virulência (GARATE ET AL., 2006; PANJWANI, 2010). O contato amebiano é um passo crucial na patogênese da infecção e é mediado por uma MBP de 130 kDa expresso na superfície de *A. castellanii* (KIM et al., 2012).

1.7 Interação ameba-fungos

Estudos recentes, onde o foco é a interação entre microrganismos do solo (fungos, bactérias ou vírus) com amebas de vida-livre (AVL) tem sugerido mecanismos distintos, pelos quais a virulência pode surgir ou ser selecionada após a interação com esse hospedeiro “acidental”. A presença de vários microrganismos no solo, incluindo predadores com diversos recursos antimicrobianos, sugere que apenas microrganismos com certas vantagens adaptativas, sobrevivam após contato com tais hospedeiros. Microrganismos

fagocíticos do solo, como *A. castellanii*, se alimentam principalmente de fungos e bactérias, utilizando enzimas hidrolíticas, como proteases, DNases, fosfolipases, e estes, por sua vez, dependem da produção de defesas químicas para sobreviverem dentro da ameba, como por exemplo produção de cápsula antifagocítica, toxinas prejudiciais à ameba, mecanismos de sequestro e aquisição de íons de ferro do hospedeiro, expressão de catalases e superóxido dismutase, entre outros. Vários patógenos podem crescer dentro de *A. castellanii*, e muitos dos fatores de sobrevivência durante essa interação podem estar envolvidos na patogenicidade em hospedeiros mamíferos, o que sugere que a virulência pode ter evoluído pela interação com predadores do solo e que esses fatores de virulência também têm funções semelhantes na virulência de mamíferos (CASADEVALL & PIROFSKI, 2001; CASADEVALL, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2016).

Os mecanismos de interação entre *Cryptococcus neoformans* e células fagocíticas (como macrófagos) parecem ser conservados na natureza, incluindo interação com *A. castellanii*. O fato é que essa interação também resulta em um aumento da virulência fúngica, principalmente devido à expressão de polissacarídeos capsulares. Líquidos polares produzidos por *A. castellanii* (como a fosfatidilcolina) podem induzir formação de células gigantes em *C. neoformans*, além de o fungo produzir fatores de virulência para sua sobrevivência, como melanina, lipases, produção de manitol, entre outros (CASADEVALL, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2016)

Van Waeyenberghe *et al.*, (2013) estudaram a interação de conídios de *Aspergillus fumigatus* e *A. castellanii* e demonstraram que, quando ambos os microrganismos eram colocados em contato direto, *A. castellanii* englobou os conídios do fungo, havendo em seguida uma exocitose do fungo não lítica para a ameba, sendo esta uma estratégia de fuga já descrita, observada em algumas leveduras para escapar de protozoários predadores. A interação entre os microrganismos causou uma permeabilização celular maior em *A. castellanii* após algum tempo. Esse efeito pode ser atribuído a componentes lançados pelo fungo enquanto no interior da ameba, como por exemplo, fumagilina. A interação também resultou em um retardamento na germinação do fungo. Várias hipóteses foram postuladas, como competição de nutrientes, excreção

de compostos inibidores pela ameba e estresse ambiental após a passagem para o interior da ameba (CHRISMAN *et al.*, 2010; HOBSON, 2000).

Steenbergen *et al.*, (2004) estudaram a interação dos fungos *Blastomyces dermatidis*, *Sporotrix schenckii* e *Histoplasma capsulatum* com *A. castellanii*. Os resultados demonstraram que o número de eventos fagocíticos por amebas e macrófagos seguiu uma tendência paralela, de modo que as células fúngicas que eram pouco fagocitadas pelas amebas também eram pouco fagocitadas pelos macrófagos. *B. dermatidis* demonstrou o menor evento fagocítico em ambos, com índice fagocítico de apenas 2,2%. Já em relação a *S. schenckii* e *H. capsulatum* o índice fagocítico foi mais alto, onde também se apresentou a maior variação entre macrófagos e amebas, com o fungo *H. capsulatum*, com índice fagocítico de 81% para amebas e 70% para macrófagos. Também demonstraram que após 48 horas de exposição aos fungos, um número considerável de amebas havia sido morto, com taxas variando de 25 – 37%.

Nunes *et al.* (2016), testaram a interação de *Fusarium solani* e *A. castellanii* nas possíveis implicações da ceratite. Eles demonstraram que os conídios de *F. solani* eram internalizados por *A. castellanii*, sendo capazes de germinar no interior da ameba. Os ensaios em co-cultivo demonstraram um aumento significativo no crescimento do fungo quando presente a ameba viva ou seu sobrenadante lisado e também *F. solani* vivo ou seu sobrenadante aumentam a sobrevivência da ameba. O encistamento de *A. castellanii* recuperados do pulmão de ratos foi aumentado. Tais resultados demonstraram que a interação fungo-ameba tem uma grande influência na sobrevivência de ambos, podendo indicar algum possível efeito na virulência, deste modo podem causar severos impactos na ceratite.

Bidochka *et al.* (2010) demonstraram que a pressão seletiva da predação de amebóides do solo em *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* pode ser crítica na manutenção de fatores de virulência, no que se diz respeito a esses fungos sobreviverem a hemófitos fagocitários de insetos. Usando as cepas de *M. anisopliae* e *B. bassiana* transformadas com GFP para investigar a internalização, sobrevivência e crescimento dentro da ameba *A. castellanii*, os pesquisadores mostram que ambos os fungos são fagocitados por *A. castellanii*, entretanto eles se demonstraram capazes de sobreviver e germinar

no interior da ameba, levando a morte do hospedeiro. Mesmo esses fungos não necessitando de um inseto para sobrevivência, eles podem manter certos fatores de virulência sob pressões seletivas que ocorrem no solo através de amebas predatórias. Há uma infinidade de interações adicionais com outros fungos, nematóides, protistas, bactérias e plantas que fornecem uma diversidade extremamente rica de interações ainda a serem estudadas e apreciadas e que contribuir para a evolução dos fatores de virulência (KURTII & KEIHANI, 2008).

Albuquerque *et al.* (2019), desafiaram *A. castellanii* com o fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, demonstrando haver uma interação com desse fungo com a ameba, sendo capaz de internalizar e matar *P. brasiliensis*. Células fungicas mortas demonstraram variações morfológicas graves, como perfurações em sua superfície. A pressão seletiva das amebas sobre fungos pode ter levado esses fungos a ter uma parede celular mais resistente às ações antimicrobianas desses predadores. Os mesmos autores realizaram também diversas passagens do fungo pela ameba, e demonstraram que após as passagens houve um decréscimo no número de internalização de leveduras, aumentando a sobrevivência do fungo.

2 Justificativa

Dermatófitos são fungos patogênicos com capacidade de metabolizar queratina e estão geralmente associados a algumas doenças bastante comuns. Afetam 20 – 25% da população mundial, podendo colonizar 30 – 70% da população sem causar doenças. Estas doenças afetam principalmente populações de baixa renda, sendo uma doença de massas, como por exemplo presidiários, onde há alta densidade demográfica / m², havendo a possibilidade que, se um detento estiver infectado, transmita a infecção para os demais. Dermatofitoses tem um alto gasto para o Estado (mais de US\$500 milhões/ano), sendo uma doença bastante reincidente, devido a forma incorreta de se realizar o tratamento.

A infecção por dermatófitos ocorre quando o hospedeiro entra em contato com o fungo proveniente do ambiente, de animais ou de outros seres humanos. *Trichophyton rubrum* é o fungo dermatófito com maior importância clínica, sendo o principal agente antropofílico de dermatofitoses. Estudos prévios demonstraram que macrófagos peritoneais de camundongos são capazes de fagocitar conídios de *T. rubrum*, porém estes se diferenciam em hifas, resultando na ruptura de membrana de macrófagos.

Considerando a presença de dermatófitos no ambiente, é importante considerar que estes fungos podem interagir com outros organismos, dentre eles, as amebas de vida livre (AVL). As AVL são protozoários oportunistas, ubíquos e amplamente distribuídos na natureza, onde o gênero *Acanthamoeba* se encaixa nesse grupo. As amebas e os fungos dermatófitos podem coexistir em um mesmo habitat e estudos têm demonstrado que, ao passar por predadores naturais, como amebas, os fungos podem ter diversos fatores de virulência ativados e muitos dos fatores de sobrevivência durante essa interação fungo-ameba podem estar envolvidos na patogenicidade em hospedeiros mamíferos.

Sabendo da importância da interação entre amebas e fungos de importância médica, torna-se importante o estudo da interação entre AVL e

fungos dermatófitos, pois, estes estudos são inovadores e poderiam auxiliar no entendimento dos mecanismos de patogenicidade dos dermatófitos.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a interação entre *Acanthamoeba castellanii* e o fungo *Trichophyton rubrum*.

3.2 Objetivos específicos

- 1 - Avaliar o encistamento de *A. castellanii* na presença e ausência de *T. rubrum* nas condições experimentais a serem testadas;
- 2 - Avaliar o índice fagocítico, atividade fungicida e liberação de *A. castellanii* quando desafiada pelo fungo *T. rubrum* ATCC 28189;
- 3 - Avaliar a influência da presença de manose na concentração de 1mM no índice fagocítico, atividade fungicida e liberação de *A. castellanii* quando desafiada pelo fungo *T. rubrum* ATCC 28189;
- 4 - Avaliar a influência da presença ou ausência dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} no índice fagocítico, atividade fungicida e liberação de *A. castellanii* quando desafiada pelo fungo *T. rubrum* ATCC 28189;
- 5 - Avaliar a influência do inibidor de citoesqueleto Citocalasina D na liberação do fungo por *A. castellanii* ;
- 6 - Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) de *A. castellanii*;
- 7 - Quantificar a produção de enzimas do sistema antioxidante (superóxido dismutase e peroxidase) e a peroxidação lipídica do fungo *T. rubrum* após 1 e 10 passagens por *A. castellanii*
- 8 - Determinar a concentração inibitória mínima de antifúngicos frente aos fungos recuperados da ameba nas condições PYG, ND e NA.

4 Metodologia

4.1 Microrganismos

Foi utilizado o fungo *Trichophyton rubrum* ATCC 28189, pertencente a coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG. A amostra de *Acanthamoeba castellanii* ALX foram cedidas gentilmente pela Professora Dra. Adriana Oliveira Costa, do Laboratório de Parasitologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

4.2 Cultivo e manutenção de microrganismos

Foram utilizados os meios ágar batata dextrose (BDA) para manutenção das culturas fúngicas e o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute, tamponado para pH 7,0 com ácido morfolino-propano-sulfônico (MOPS) 0,165M (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e suplementado com 2% de glicose para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

O inóculo fúngico foi preparado a partir de culturas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28189, incubadas a 28°C, por 14 dias em tubos contendo meio BDA inclinado para a produção de conídios. As colônias do fungo foram cobertas com 5 ml de solução salina estéril (0,9%) acrescida de Tween 80 para obtenção de uma suspensão. A suspensão foi homogeneizada em vórtex e a mistura de fragmentos de conídios e hifas foi filtrada em filtro Qualy Ø 9,0 cm (tamanho dos poros: 14 µm), que retém fragmentos de hifas e permite a passagem apenas de microconídios (SANTOS, HAMDAN, 2005 com modificações). A quantidade de inóculo foi ajustada por contagem em câmara de Neubauer para uma concentração de 5×10^5 UFC/mL.

O isolado de *Acanthamoeba castellanii* ALX foi mantido em meio PYG (20 g/L de proteose-peptona, 1 g/L de extrato de levedura, 0,1 M de glicose, 4 mM de MgSO₄, 0,4 mM de CaCl₂, 3,4 mM citrato de sódio, 0,05 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, 2,5 mM de Na₂HPO₄ e KH₂PO₄, pH 6,5) (Alfieri *et al.*, 2000), a temperatura de 32° C. Este isolado foi obtido de um caso de ceratite amebiana

na cidade de Vitória, Espírito Santo, Brasil. De acordo com Duarte *et al.*, (2013), este isolado apresenta características de maior patogenicidade, tendo características do grupo morfológico II e pertencente ao genótipo T4. De acordo com Siddiqui e Khan (2012), *A. castellanii* pertencente ao genótipo T4 apresenta a parede do cisto constituída por 33% de proteína, 4 - 6% de lipídios, 35% de carboidratos (principalmente celulose), 8% de cinzas e 20% de materiais não identificados. Por meio da técnica de cromatografia gasosa combinada com espectrometria de massa, observou-se uma alta porcentagem de galactose e glicose e pequenas quantidades de manose e xilose na composição de carboidratos das paredes do cisto (DUDLEY, JARROLL & KHAN, 2009). De acordo com os mesmos autores, *A. castellanii* apresenta na parede do seu cisto uma porcentagem de 3,2% de terminal manopirranose e 7,8% de 4,6 manopirranose.

4.3 Desenho experimental

Para responder as indagações propostas nesse trabalho, os seguintes experimentos foram propostos:

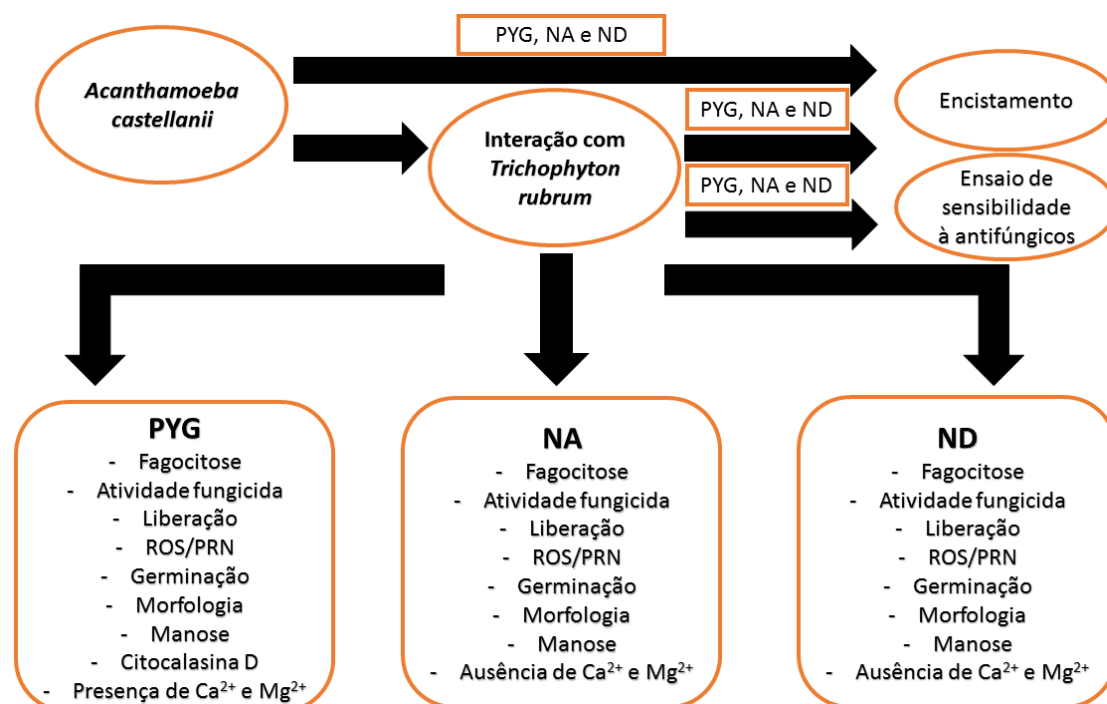


Figura 1. Desenho experimental proposto para resolução dos objetivos do trabalho – fluxograma do desenho experimental com os experimentos propostos para desenvolvimento e

resolução do trabalho. Foram realizados ensaios para o entendimento da cinética de encistamento da ameba e germinação do fungo nos meios, interação entre esses microrganismos, atividade fungicida da ameba, alterações na virulência do fungo e influência de manose.

Foram testadas três condições para os experimentos seguintes, com o objetivo de mimetizar as condições ambientais em que podem ocorrer a interação entre *A. castellanii* e *T. rubrum*. A condição PYG, meio comumente utilizado para cultivo axênico de *A. castellanii*, onde a ameba é colocada para aderir, por duas horas, em seguida foi realizada a infecção por *T. rubrum*, sendo coletadas amostras nos tempos 1, 4 e 24 horas; a condição infecção prévia adição de salina Neff (ND) - salina esta que, através de depleção de nutrientes, faz com que a ameba mude de sua forma trofozoíto para cisto - onde a ameba foi colocada em meio PYG para aderir por duas horas, em seguida foi realizada a infecção pelo dermatófito, e, após uma hora foi trocado o meio PYG por salina Neff, sendo coletadas amostras nos tempos de 1, 4 e 24 horas; e a condição Neff (NA), que faz com que haja o encistamento da ameba, onde a ameba foi colocada para aderir por duas horas em meio PYG, em seguida troca-se PYG por salina de Neff, que foi deixada em contato com a ameba por 3 horas, em seguida foi realizada a infecção pelo dermatófito, coletando-se amostras nos tempos de 1, 4 e 24 horas.

Para a avaliação do papel da manose 1mM na interação, essa foi adicionada ao meio contendo *A. castellanii* uma hora antes da infecção por *T. rubrum* e realizados ensaios de fagocitose, atividade fungicida e liberação (YOO & JUNG, 2012). Ensaio com presença ou ausência de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} foram realizados, com intuito de se verificar a importância destes íons na fagocitose, atividade fungicida e liberação. Foi realizado ensaio de liberação também com presença de citocalasina D, para se verificar se a exocitose do fungo do interior da ameba era promovida pela ameba ou pelo próprio fungo.

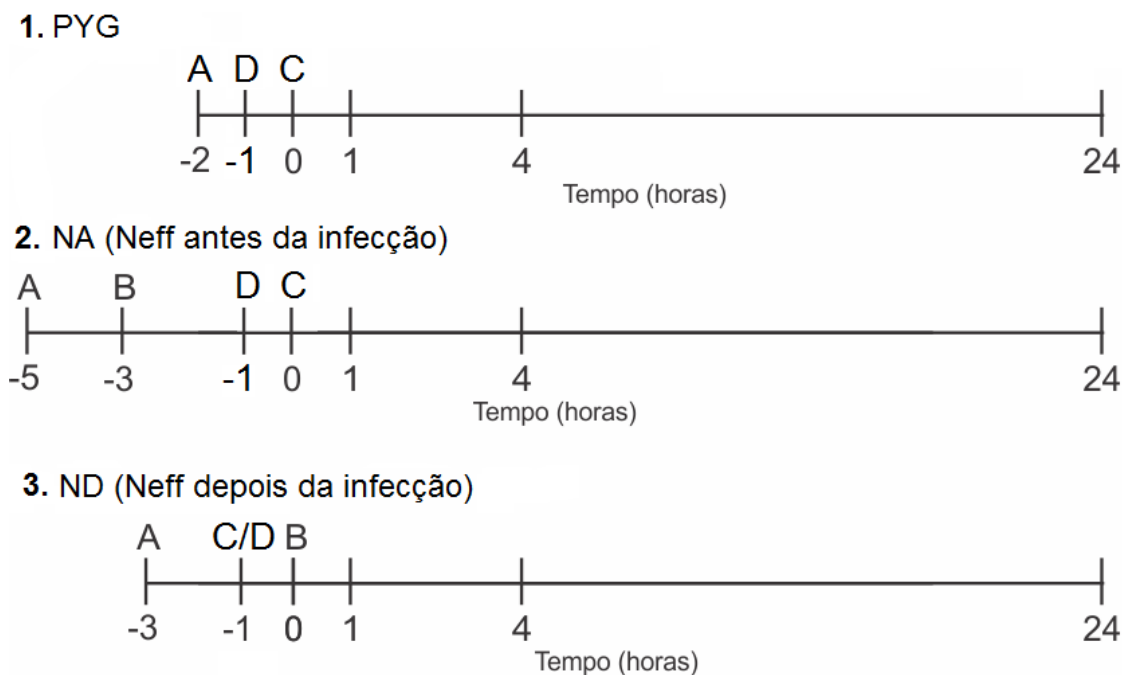


Figura 2. Condições experimentais 1) PYG 2) NA (Neff antes da infecção por *T. rubrum*); 3) ND (Neff depois da infecção por *T. rubrum*) Onde “A” representa adesão de *Acanthamoeba castellanii* as lamínulas; “B” adição do meio Neff e “C” a infecção com o fungo *T. rubrum* e “D” adição de manose ou citocalasina D.

4.4 Avaliação da influência das condições experimentais no encistamento da ameba

Foram testadas as condições PYG, infecção por *T. rubrum* realizada antes da adição de salina de Neff (ND) e adição de salina de Neff previamente a infecção por *T. rubrum* (NA), a fim de se forçar o encistamento de *A. castellanii*.

Para esse ensaio, os trofozoítos foram crescidos previamente a 20° C em garrafas de cultura estéreis por uma semana em meio PYG. Inicialmente, na base das placas de 24 poços foram colocadas lamínulas circulares 13-16 mm. Em seguida, 1×10^5 células de *A. castellanii* AXL em meio PYG foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 horas a 28 °C. Após os tempos de 1, 4 ou 24 horas a 28° C o sobrenadante da cultura foi desprezado, os poços foram lavados com PBS, as lamínulas retiradas, fixadas e coradas com

panótico (COSTA et al., 2016). Foram então contadas por microscopia 100 amebas em diferentes campos e o número de amebas encistadas foi determinado. Os resultados foram expressos em “% de células encistadas”.

4.5 Ensaio de fagocitose em ameba

Foram realizados ensaios de fagocitose com intuito de averiguar se havia interação entre o fungo *T. rubrum* e a ameba *A. castellanii*.

Células de *T. rubrum* ATCC 28189 foram submetidas a ensaio de fagocitose com *Acanthamoeba castellanii* ALX para avaliar a possível relação entre esses fungos e ameba. Para esse ensaio, os trofozoítos foram crescidos previamente a 20° C em garrafas de cultura estéreis por uma semana em meio PYG. Inicialmente, na base das placas de 24 poços foram colocadas lamínulas circulares 13-16 mm. Em seguida, 1×10^5 células de *A. castellanii* AXL em meio PYG foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 horas a 28 °C. Após, o sobrenadante da cultura foi removido e as células lavadas com PBS (Phosphate Buffered Saline) estéril. Para infectar as amebas, 5×10^5 células de *T. rubrum*, previamente crescidas em meio BDA (Batata-dextrose-ágar), foram adicionadas separadamente em cada poço e estas co-culturas foram incubadas por 1, 4 ou 24 horas a 28° C. Ao final de cada tempo, o sobrenadante da cultura foi desprezado, os poços foram lavados com PBS, as lamínulas retiradas, fixadas e coradas com panótico (COSTA et al., 2016). Foram contadas 100 amebas em diferentes campos e o número de conídios no interior dessas amebas. Também foi observado por microscopia a taxa de cistos e trofozoítos dentre as amebas contadas. Os resultados foram expressos em “fungos internalizados/100 amebas”.

4.6 Avaliação da influência do encistamento da ameba na fagocitose de conídios de dermatófitos

O ensaio foi realizado baseado nos estudos de Boratto *et al.*, 2014 e nas condições descritas no item 4.4. Foram testadas as condições PYG, infecção por *T. rubrum* realizada antes da adição de salina de Neff (ND) e adição de

salina de Neff previamente a infecção por *T. rubrum* (NA), a fim de se forçar o encistamento de *A. castellanii*.

Células de *T. rubrum* ATCC 28189 foram submetidas a ensaio de fagocitose com *Acanthamoeba castellanii* ALX para avaliar a possível relação entre esses fungos e ameba. Para esse ensaio, os trofozoítos foram crescidos previamente a 20° C em garrafas de cultura estéreis por uma semana em meio PYG. Inicialmente, na base das placas de 24 poços foram colocadas lamínulas circulares 13-16 mm. Em seguida, 1×10^5 células de *A. castellanii* AXL em meio PYG foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 horas a 28 °C. Após, o sobrenadante da cultura foi removido e as células lavadas com PBS (Phosphate Buffered Saline) estéril. Para infectar as amebas, 5×10^5 células de *T. rubrum*, previamente crescidas em meio BDA (Batata-dextrose-ágar), foram adicionadas separadamente em cada poço e estas co-culturas foram incubadas por 1, 4 ou 24 horas a 28° C. Ao final de cada tempo, o sobrenadante da cultura foi desprezado, os poços foram lavados com PBS, as lamínulas retiradas, fixadas e coradas com panótico (COSTA et al., 2016). Foram contadas 100 amebas em diferentes campos e o número de conídios no interior dessas amebas. Também foi observado por microscopia a taxa de cistos e trofozoítos dentre as amebas contadas. Os resultados foram expressos em “fungos internalizados/100 amebas”.

4.7 Avaliação da influência dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} na interação entre *T. rubrum* e *A. castellanii*

Foram realizados ensaios de fagocitose como descritas no item 4.5, nos quais foram adicionados ou não no meio os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} ou ambos (Ca^{2+} e Mg^{2+}). O objetivo foi verificar se a adição ou retirada desses íons modificariam o perfil de fagocitose de *A. castellanii* desafiada por *T. rubrum*, pois de acordo com Fu e Casadevall (2018), a presença desses íons divalentes potenciam a capacidade predatória da ameba. Nas condições com meio Neff, foram retiradas as fontes desses íons ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), já na condição PYG foram adicionados os mesmos íons na mesma concentração que fariam parte da Salina de Neff. Foram contadas 100 amebas em diferentes campos e o número de conídios no interior dessas amebas. Também foi observado por

microscopia a taxa de cistos e trofozoítos dentre as amebas contadas. Os resultados foram expressos em “fungos internalizados/100 amebas”.

As condições avaliadas foram: PYG + *A. castellanii* + Tr; PYG + Ca²⁺ + *A. castellanii* + Tr; PYG + Mg²⁺ + *A. castellanii* + Tr; PYG + Ca²⁺ + Mg²⁺ + *A. castellanii* + Tr; NA + *A. castellanii* + Tr; NA (-Ca²⁺) + *A. castellanii* + Tr; NA (-Mg²⁺) + *A. castellanii* + Tr; NA (-Ca²⁺ -Mg²⁺) + *A. castellanii* + Tr; ND + *A. castellanii* + Tr; ND (-Ca²⁺) + *A. castellanii* + Tr; ND (-Mg²⁺) + *A. castellanii* + Tr; ND (-Ca²⁺ -Mg²⁺) + *A. castellanii* + Tr. Foram utilizados os tempo de de 1 e 4 horas apenas, devido a germinação do fungo e resultados foram expressos em “fungos internalizados/100 amebas”.

4.8 Avaliação da influência de manose na interação entre *T. rubrum* e *A. castellanii*

Foram realizados ensaio de fagocitose como descritas no item 4.5, onde *A. castellanii* foi incubada durante 1h em solução com 1 mM de manose (YOO & JUNG, 2012; com modificações) nas condições PYG, ND e NA. O intuito foi verificar se a saturação dos receptores de manose no meio interfere na interação dos dermatófitos com a ameba (ALLEN & DAWIDOWICZ, 1990; YOO & JUNG, 2012). A manose foi adicionada 1 hora antes da infecção por *T. rubrum* e as leituras foram realizadas nos tempos de 1 e 4 horas. Foram contadas 100 amebas em diferentes campos e o número de conídios no interior dessas amebas. Também foi observado por microscopia a taxa de cistos e trofozoítos dentre as amebas contadas. Os resultados foram expressos em “fungos internalizados/100 amebas”.

4.9 Ensaio de atividade fungicida e liberação do fungo do interior da ameba.

Os ensaios de atividade fungicida foram realizados com o objetivo de se verificar a capacidade antifúngica da ameba *A. castellanii* frente ao desafio por *T. rubrum*, enquanto no ensaio de liberação do fungo o objetivo foi verificar se era liberado do interior da ameba.

O ensaio de capacidade fungicida da ameba foi realizado de acordo com a metodologia de Steenbergen, Shuman e Casadevall (2001), com algumas modificações. As células dos fungos foram adicionadas a culturas de *A. castellanii* em placas de cultura de 24 poços em uma razão de 5 células fúngicas:1 ameba e foram incubadas a 28 ° C. A quantificação de células fúngicas viáveis foi determinada em 1, 4 e 24 h, contando unidades formadoras de colônias (UFC). Em cada intervalo de tempo, as células da ameba e dos fungos foram desagregadas do fundo dos poços de cultura e as células de *A. castellanii* foram lisadas ao serem puxadas através de uma agulha de calibre 27G, de 5-7 vezes. Em cada intervalo de tempo, foram utilizados cinco poços de cultura por espécie para quantificar a carga fúngica, expressa em unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). Para cada poço, as diluições em série foram plaqueadas em duplicata em BDA, que foram incubadas a 28 ° C durante sete dias. A partir da recuperação da carga fúngica (UFC/mL) nos diferentes tempos, foi avaliada a atividade fungicida de *A. castellanii* frente a linhagem de dermatófito nas condições avaliadas (PYG, ND e NA). Em paralelo, o teste de liberação do fungo foi realizado, em placas separadas, sendo uma medida da quantidade de conídios que saíram da ameba. Para tal, foi realizada a lavagem dos poços 2 vezes com PBS, para remoção de fungos no meio e em seguida adicionado PYG nos poços. Este permaneceu por 3 horas, incubada a 28°C para se recuperar o fungo que foi exocitado pela ameba e plaqueado em BDA. Foram e não plaqueados 50 µL em placas de 60x15 mm contendo BDA. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas a 28°C durante 72 horas e realizado a contagem de UFC. Os resultados foram dados em “UFC/mL”.

4.10 Ensaio com Citocalasina D

Foram realizados ensaios em meio PYG de fagocitose e liberação do fungo do interior da ameba na presença de citocalasina D (um inibidor de polimerização de actina), onde tem-se demonstrado que na presença deste inibidor, a fagocitose é abolida (ALSAM *et al.*, 2005). Esse ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 4.5 para fagocitose e 4.9 para

ensaios de liberação. A citocalasina D foi adicionada 1 hora antes da infecção por *T. rubrum* na fagocitose. Na liberação, após a retirada do fungo através de lavagem por 2x com PBS, foram adicionados ao poço PYG com adição de Citocalasina D na concentração de 2 μ M (ALSAM et al., 2005). Este permaneceu por 3 horas, incubada a 28°C para se recuperar o fungo que foi excitado pela ameba e plaqueado em BDA. Foram e não plaqueados 50 μ L em placas de 60x15 mm contendo BDA. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas a 28°C durante 72 horas e realizado a contagem de UFC. O objetivo deste ensaio foi verificar se o fungo sofria excitose através de modulações do citoesqueleto amebiano ou se seria um mecanismo de fuga do fungo. Os resultados foram expressos em “fungos internalizados/100 amebas” para fagocitose e em “UFC/mL” para liberação.

4.11 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs)

A quantidade endógena de EROs e ERNs foi mensurada por um ensaio fluorimétrico utilizando uma sonda específica (SOARES et al., 2011). Após uma, quatro e vinte quatro horas, a suspensão de conídios e de ameba e foram incubados por 30 minutos com 2,7-dichlorofluorescina diacetato (DCFH-DA; Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e dihidrorodamina 123 (DHR 123; Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), para dosagem de EROs (espécies reativas de oxigênio) e ERNs (espécies reativas de nitrogênio), respectivamente. A sonda DHR123 quantifica a ERN peroxinitrito. A fluorescência foi mensurada em um fluorímetro (Synergy 2 SL Luminescence Microplate Reader; Biotek), utilizando comprimentos de onda de excitação e de emissão de 500nm (SANTOS et al., 2014). Os dados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência \pm SE.

Foram avaliadas a produção de EROs (peróxido de hidrogênio) e ERNs (peroxinitrito) dos seguintes grupos: ameba; ameba + fungo na condição PYG; ameba + fungo na condição ND e ameba + fungo na condição NA.

4.12 Ensaio de peroxidação lipídica

Os produtos da peroxidação lipídica foram mensurados como substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Ferreira *et al.*, 2013). Resumidamente, 20.0 mg da massa celular fúngica foram congeladas e homogeneizadas com 1000 μ L em ácido fosfórico a 1,1% gelado. 400 μ L do homogeneizado foram misturados com 400 μ l de ácido tiobarbitúrico a 1% (Sigma-Aldrich) preparado em NaOH 50 mM contendo 0,1 mM de hidroxitolueno butilado e 200 μ L de ácido fosfórico a 7% (todas as soluções foram mantidas em gelo durante a manipulação. Subsequentemente, as amostras (pH 1,5) foram aquecidas durante 60 min a 98°C e foram adicionados 1500 μ L de butanol. A mistura foi misturada vigorosamente utilizando um vortex e centrifugada durante 5 min a 2000 g. A camada orgânica foi transferida e a absorbância foi medida a 532 nm (espectro Termo Scientific Multiscan, Termo Ficher Scientific). Os valores de TBARS foram calculados usando o coeficiente de extinção de 156 mM⁻¹cm⁻¹.

4.13 Enzimas Antioxidantes

Células de *T. rubrum* ATCC 28189 recuperadas de *A. castelanii* (20mg de peso úmido) foram ressuspendidas em 2 mL de meio de lise (250 mM sacarose, 10 mM TrisHCl, pH 7.5, 1 mM PMSF) e 50 mg de pérolas de vidro (0.45 mm). A suspensão foi agitada mecanicamente em vórtex, por 5 ciclos de 270s cada de 10.000 vibrações/minuto. O homogenato foi coletado e centrifugado a 1000 g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 15.000 g por 40 min a 4 °C para remover as células não rompidas e as pérolas de vidro. Para determinação das proteínas solúveis no extrato foi utilizado o teste de Bradford, por meio de uma curva padrão com albumina bovina (Ferreira *et al.*, 2015).

4.13.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade SOD foi mensurada pela inibição da autooxidação do pirogalol (Khan *et al.*, 2011), com adaptações. O controle foi realizado com 100 µL de meio de lise mais 2000 µL de pirogalol (20 mM; Sigma-Aldrich) diluído em PBS (Tampão Fosfato Salino) (pH 8,5). Nas amostras, 100 µL de extrato livre de células foram adicionados ao pirogalol. A inibição da autooxidação foi monitorada a cada 60 segundos. As unidades de SOD foram consideradas como autooxidação do pirogalol, como descrito abaixo:

Unidade de SOD mL⁻¹ amostra = [(A-B) / A x 50 x 100] x 0.6 (fator de diluição)

Onde, A é a diferença da absorbância por 1 minuto no controle e B, a diferença na absorbância por 1 minuto, nas amostras. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

4.13.2 Atividade Peroxidase (PER)

A atividade PER foi realizada de acordo com a metodologia proposta previamente (Soares *et al.*, 2011) com adaptações. 100 µL de cada extrato livre de células foram incubados por 13 minutos junto com 2000 µL de uma solução contendo HEPES 25mM, 10 mM H₂O₂ e 4 mM guaiacol (Sigma Aldrich), pH 6.8. As mudanças na absorbância foram monitoradas a 470 nm utilizando o valor de coeficiente de extensão molar de 26,61 M⁻¹cm⁻¹ para o produto tetraguaiacol formado pela reação enzimática. Os resultados foram expressos em nmols/mg de proteína.

4.14 Teste de microdiluição em placa

Os testes de sensibilidade de *T. rubrum* ATCC 28189 frente a dois antifúngicos do grupo dos azólicos e um do grupo das alilaminas foram realizados conforme manual M38-A2 do CLSI (2008). Foram utilizados os antifúngicos Itraconazol (Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), Cetoconazol (Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e Terbinafina (Sigma- Aldrich, St.

Louis, Missouri, USA). As concentrações foram baseadas nas CIM obtidas por Santos & Hamdan (2007):

Itraconazol: 4 µg/mL - 0,007 µg/mL.

Cetoconazol: 16 µg/mL - 0,03 µg/mL .

Terbinafina: 0,5 µg/mL - 0,0005 µg/mL .

Os testes de sensibilidade foram realizados em placas com 96 poços de fundo chato esterilizadas. Um volume de 100 µL de cada diluição seriada do antifúngico foi dispensado nos poços das placas de microdiluição. Colônias de fungos recuperados das amebas e crescidos por 7 dias em meio BDD foram testados. As colônias de fungos foram cobertas com 5 ml de solução salina estéril (0,9%) acrescida de 1% de Tween 80 para obtenção de uma suspensão. A suspensão foi homogeneizada em vórtex. As densidades das suspensões foram ajustadas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 520 nm e uma transmitância de 70 a 72%, a qual corresponde à concentração de 2×10^6 a 4×10^6 UFC/mL (SANTOS, HAMDAN, 2005). As suspensões dos inóculos foram diluídas (1:50) em meio RPMI para obter um número de células variando de 2×10^4 a 4×10^4 UFC/mL. Em seguida, foram adicionados 100 µL do inóculo do isolado de *T. rubrum*, resultando em um volume final de 200 µL/poço. As placas foram incubadas a 28°C e as concentrações inibitórias mínimas (CIM) lidas após 7 dias de incubação (CLSI, 2008). A leitura foi realizada pela observação visual da inibição de crescimento em cada poço e comparada com o crescimento observado no poço do controle positivo (CLSI, 2008). Foram utilizados nos antifúngicos Itraconazol e Terbinafina 100% de inibição e para o antifúngico cetoconazol CIM₅₀. Para o controle negativo foi plaqueado o inóculo fúngico sem a presença do antifúngico.

4.15 Análise estatística

Os resultados serão analisados utilizando-se testes estatísticos para comparar as diferenças significativas entre os grupos estudados, com o apoio instrumental do software PRISMA 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). O nível de 95% de significância será considerado para que os valores sejam significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5 Resultados

5.1 A presença de *Tr* induz encistamento em *Aix*

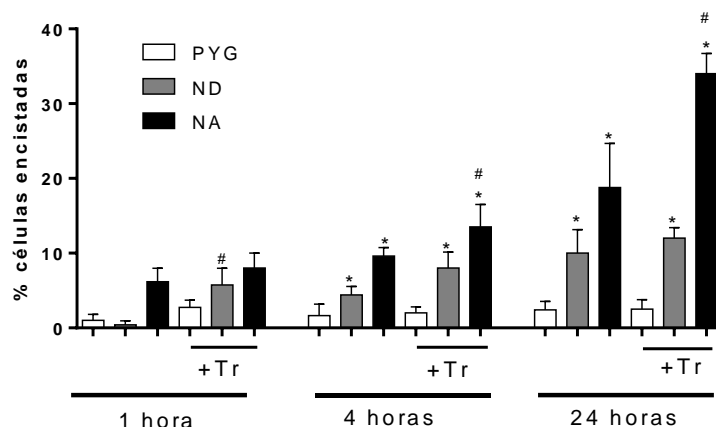


Figura 3. A presença de *Tr* induz encistamento em *Aix*. O fenômeno foi observado em meio de cultivo de trofozoítos (PYG) e meio de encistamento (Neff). Os dados são apresentados em forma de porcentagem de células encistadas de *Aix* nas diferentes condições nutricionais (PYG, infecção antes de adição de meio de encistamento Neff [ND] e infecção após adição de meio de encistamento Neff [NA] na ausência ou presença de *Tr*. *: $p < 0,05$ em relação ao tempo inicial (1 hora); #: $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo não-infectado.

Para analisar como a presença do *Tr* interfere na atividade metabólica de *Aix*, a ameba foi infectada na condição trofozoíto (PYG e ND) e cisto (NA). O meio Neff, que induz encistamento de *Aix*, foi adicionado após infecção do trofozoíto (ND). Em *Aix* cultivada na presença de PYG, a quantidade de cistos permaneceu inalterada (média abaixo de 3%) até o período máximo de experimento (24 horas) e a co-incubação com *Tr* não gerou alterações nesse perfil. A adição de salina Neff (NA) altera já na primeira hora o metabolismo da ameba, elevando o percentual de encistamento, que atinge níveis máximos no tempo de 24 horas (18%); e a presença do *Tr* aumenta significativamente a diferenciação de trofozoítos em cistos (34%).

5.2 Influência da condição PYG na interação entre *Tr* e *Alx*

Foram realizados ensaios na condição PYG para se verificar a influência dessa condição na interação entre *A. castellanii* e *T. rubrum*.

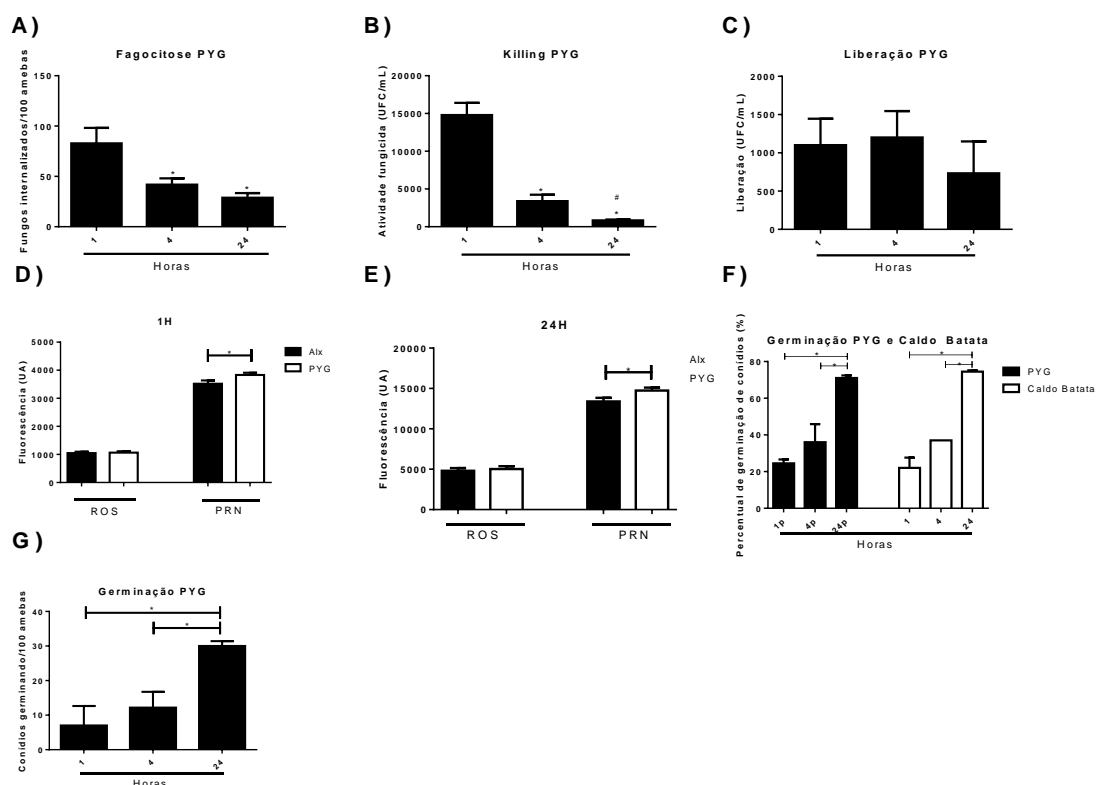


Figura 4 – Influência da condição PYG na interação entre *Tr* e *Alx* - A) Ensaio de fagocitose de *Tr* por trofozoítos de *Alx* nas condições PYG. Foram contadas 100 amebas por hora e o número de conídios internalizados por essas amebas. B) Ensaio de atividade fungicida de *Alx* contra *Tr*. Número de unidades formadoras de colônias recuperadas do interior de *Alx* nas condições PYG. 1, 4 e 24 horas após infecção com *Tr*. C) Após uma hora de infecção, esporos extracelulares foram removidos e foi determinada taxa de liberação de esporos internalizados por cistos e trofozoítos das condições PYG. D) Ensaio de produção de ROS e PRN nas condições *Alx* (controle sem fungo em PYG), PYG no tempo de 1 hora. E) Ensaio de produção de ROS e PRN nas condições *Alx* (controle sem fungo em PYG), PYG no tempo de 24 horas. F) Gráfico de porcentagem de germinação de conídios de *T. rubrum* com o passar do tempo em meio PYG e caldo batata. G) Germinação de *T. rubrum* no interior de *A. castellanii* nas condições PYG. *: $p < 0,05$ entre diferentes tempos na mesma condição. #: $p < 0,05$ entre condições diferentes no mesmo tempo.

Após testar como o fungo interfere no encistamento da ameba, testamos a capacidade de trofozoítos engolfar e liberar *Tr* na condição PYG. Os resultados apresentados na figura 4A mostram que *A/x* internaliza altas taxas de *Tr* 1 hora após infecção e que o número de esporos observados no seu interior decresce significativamente nos demais tempos testados (aproximadamente 100 esporos internalizados na primeira hora contra aproximadamente 30 esporos internalizados em 24 horas). Com relação a atividade fungicida (figura 4B) tem-se que com o passar das horas, a ameba apresenta maior efetividade em sua atividade fungicida, onde se tinha aproximadamente 15000 UFC/mL recuperadas no tempo de uma hora, decaem para aproximadamente 900 UFC/mL em vinte e quatro horas. A figura 4C apresenta os dados de liberação, estes apresentam-se invariáveis com o passar do tempo de estudo, mantendo-se em aproximadamente 1000 UFC/mL.

Na figura 4D e E, dados resultados prévios de internalização em PYG, foi quantificada a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por *A/x*, utilizando sondas específicas. Conforme observado nessas figuras, a produção de PRN é mais expressiva nos dois tempos testados, havendo variação estatística em relação ao controle com *A/x* sem a presença do fungo, o que não ocorre com relação a produção de ROS. A infecção com *Tr* aumenta produção de PRN por *A/x* 1 e 24 horas após infecção ($p < 0,05$) na condição PYG.

Na figura 4F foram realizados dados para verificar se o fungo germinaria de modo diferente em PYG que no controle, o qual foi utilizado Caldo Batata, e verificou-se que em ambos os meios de cultura o fungo apresentou mesma taxa de germinação. Com esse dado, verificou-se então a habilidade do fungo germinar no interior das amebas (figura 4G), onde pudemos observar que, com o passar das horas, aumentou-se o número de fungos germinando no interior de *A. castellanii*, sendo que no tempo de 24 horas, observou-se um número de aproximadamente 30 fungos germinando no interior de *A/x*.

Foram então registradas imagens, através de microscopia óptica (figura 5), onde foram verificadas inclusive presença de hifas rompendo as células ameboides.

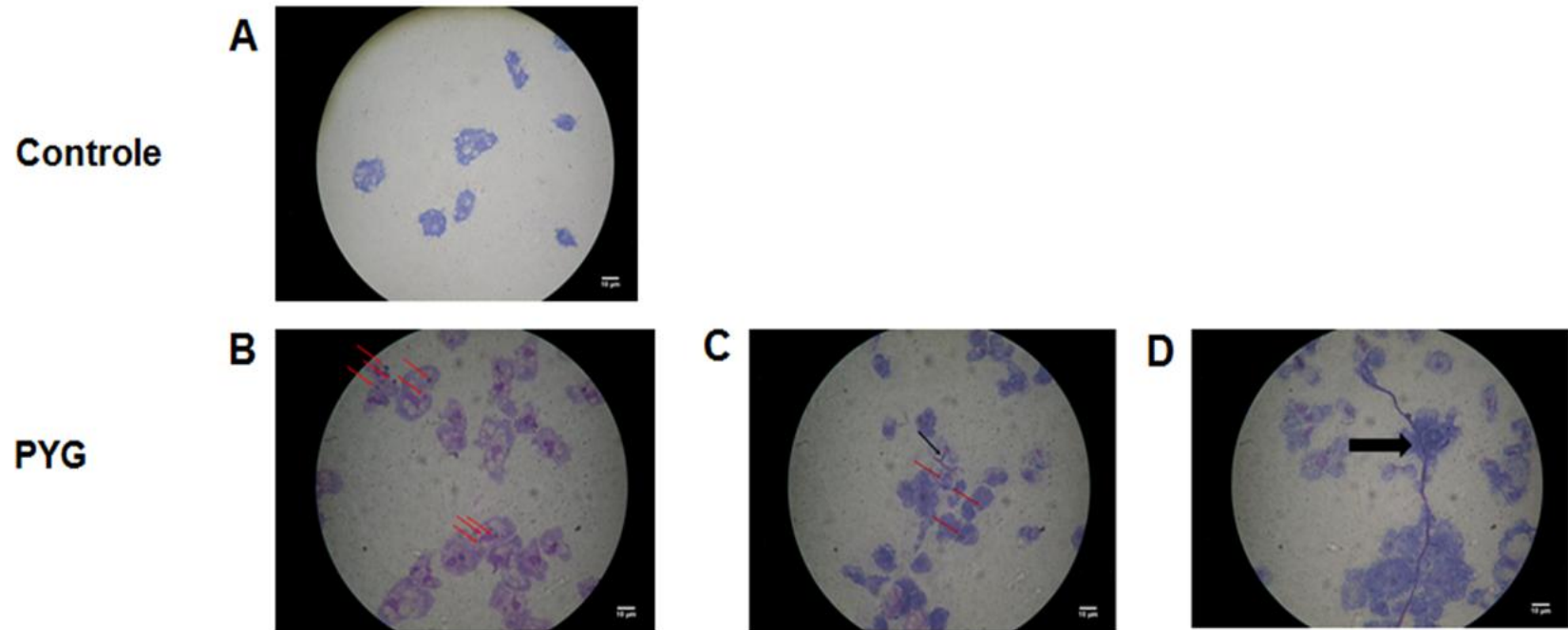


Figura 5 - Micrografia em 100x do ensaio de fagocitose com *A. castellanii* desafiado com *T. rubrum* na condição PYG - (A) controle de *A. castellanii*; (B) PYG com 1 hora; (C) PYG com 4 horas; (D) PYG com 24 horas. Setas vermelhas indicam conídios, setas pretas finas indicam conídios germinando e setas pretas grossas indicam formação de hifas. Barra de 10 μ m.

Foram realizados ensaios para verificar se os fungos após passagens pela ameba apresentavam maior produção de enzimas antioxidantes (figura 6):

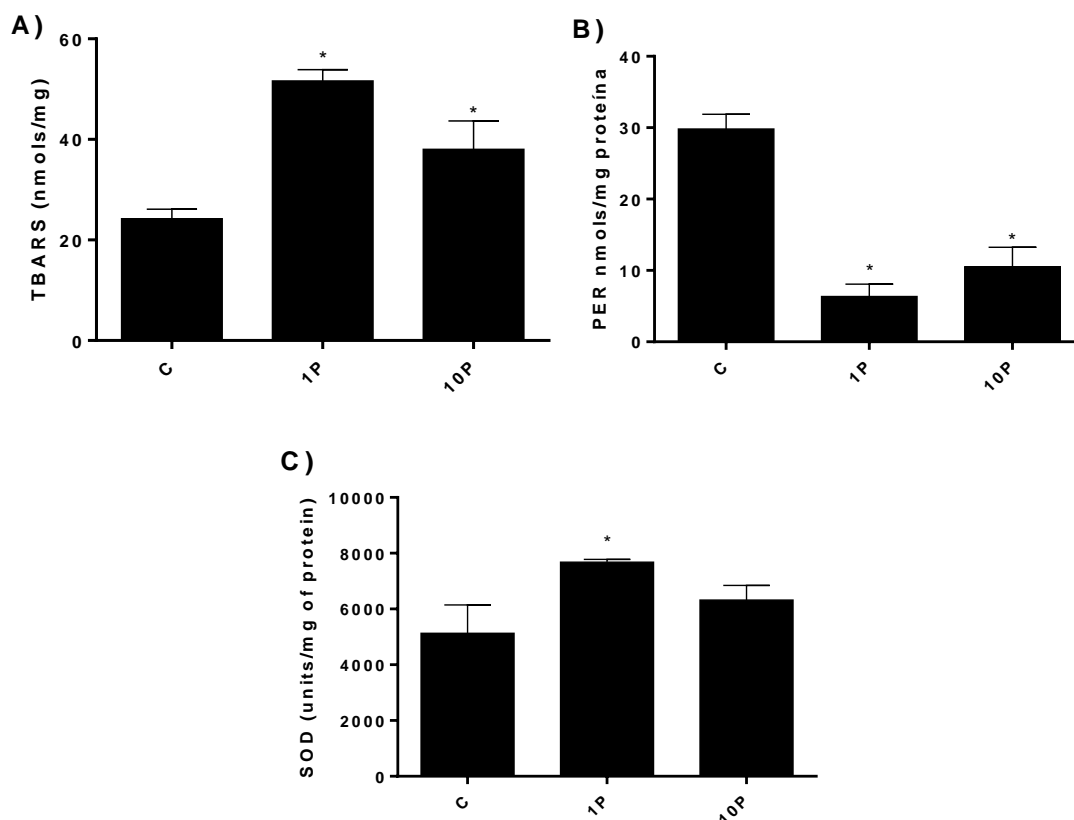


Figura 6 – Sucessivas passagens de Tr por *Aix* alteram sua capacidade antioxidante. **A)** ensaio de peroxidação lipídica, **B)** Atividade da enzima peroxidase; **C)** Atividade da enzima Superóxido dismutase. C: Tr sem passagem previa por *Aix*; 1P: Tr após 1 passagem pela ameba; 10P: Tr após 10 passagens pela ameba. *: $p < 0,05$ em relação ao controle.

É possível observar que no ensaio de peroxidação lipídica (figura 6A), tem-se uma diferença significativa entre o controle e as demais condições referentes as passagens do fungo pela ameba. Já no caso da peroxidase (figura 6B), observa-se o evento contrário com maior produção pelo controle do que os fungos que passaram pela ameba.

Na produção de enzimas superóxido dismutase (figura 6C), 10P e controle não apresentam diferenças significativas, onde apenas 1P se diferencia estatisticamente das demais.

Foram realizados ensaios de fagocitose na presença de manose, na concentração de 1 mM para se averiguar a influência da presença deste açúcar na interação de *T. rubrum* e *A. castellanii*. Tem-se que, na fagocitose (figura 7A) com o tempo de uma hora tem-se em PYG – aproximadamente 125 conídios foram internalizados, não havendo variação com relação a presença de manose, entretanto no tempo de 4 horas é possível se observar que há variação estatística entre o controle sem presença de manose e o com presença de manose (PYG – aproximadamente 140 conídios internalizados; PYG 1mM de manose – aproximadamente 80 conídios internalizados). O ensaio de atividade fungicida na presença de manose (7B) observa-se que entre os tempos de 1 e 4 horas há diferenças significativas na atividade fungicida da ameba, entretanto não apresentam diferenças entre as condições no mesmo tempo. Já em relação a liberação (7C), é possível se observar que há diferenças estatísticas no tempo de 1 e 4 horas nas próprias condições, havendo aumento na liberação no tempo de 4 horas e também no tempo de 4 horas temos que entre as condições há diferença, havendo uma maior liberação na condição sem manose do que na condição com manose (15000 UFC/mL e 10000 UFC/mL respectivamente).

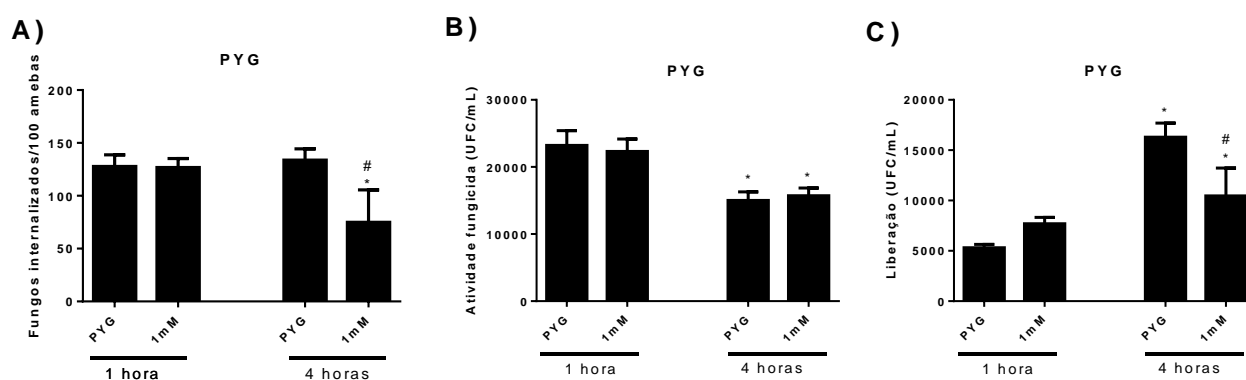


Figura 7 – Ensaio de fagocitose, atividade fungicida e liberação nas condições PYG e PYG com adição de 1mM de manose. A) Ensaio de fagocitose do fungo *T. rubrum* pela ameba *A. castellanii* na presença de 1 mM manose na condição PYG. Foram contadas 100 amebas por hora e o número de conídios internalizados por essas amebas. B) Atividade fungicida do fungo *T. rubrum* pela ameba *A. castellanii* na presença de manose (1 mM) na condição PYG. C) Liberação de *Tr* por *Alx* na presença de manose na condição PYG. *: p<0,05 entre diferentes tempos na mesma condição. #: p<0,05 entre condições diferentes no mesmo tempo.

Verificou-se também a capacidade de germinação de *Tr* no interior da ameba nas condições com presença de manose. Na figura 8, PYG sem manose 1 hora apresenta diferença significativa com PYG de 4 horas com relação a germinação de conídios, assim como a condição 1 mM de manose também apresenta diferença significativa com o passar do tempo. Com relação a hifas, há diferença entre todas as condições entre o tempo de 1 hora e o tempo de 4 horas.

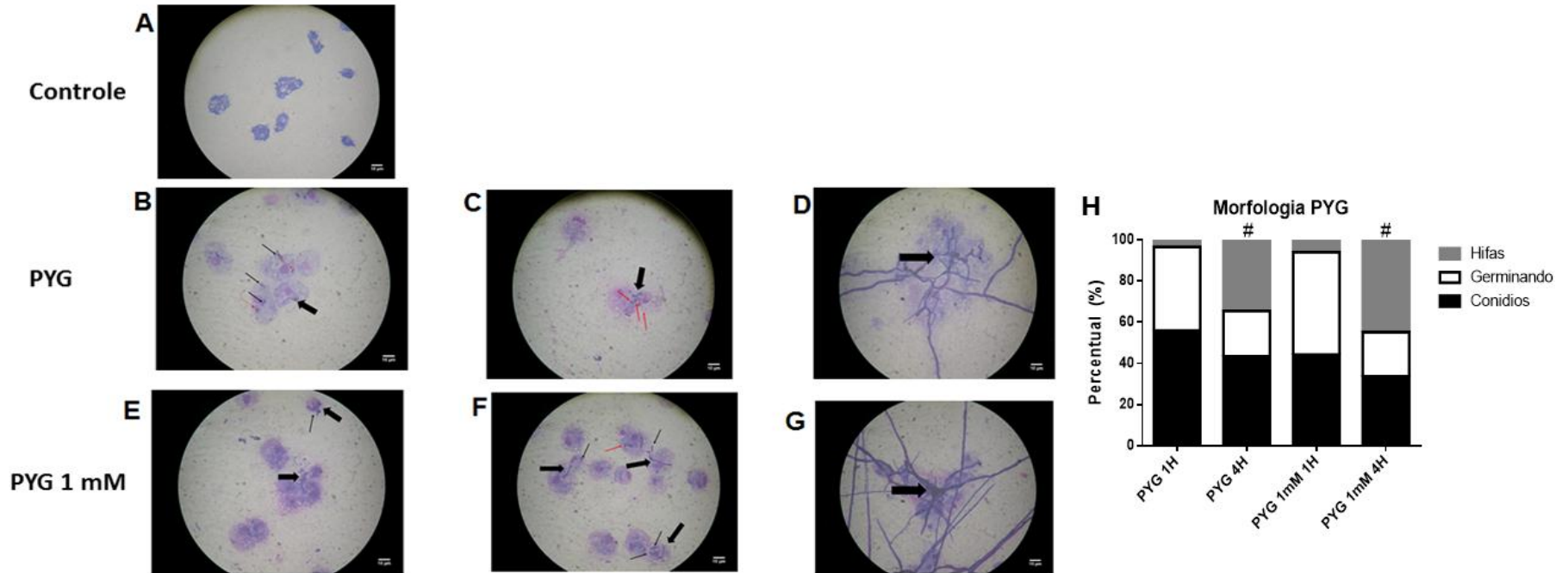


Figura 8 - Micrografia em 100x do ensaio de fagocitose com *A. castellanii* desafiado com *T. rubrum* e gráfico de germinação de PYG com presença de manose: nas condições PYG sem manose e com 1 mM e 10 mM de manose (A) controle de *A. castellanii*; (B) PYG com 1 hora; (C) PYG com 4 horas; (D) PYG com 24 horas; (E) PYG 1 mM com 1 hora; (F) PYG 1mM com 4 horas; (G) PYG 1 mM com 24 horas; (H) percentual de conídios, fungos germinando e hifas no interior de *A. castellanii* nas condições PYG com presença de 1mM de manose. Setas vermelhas indicam conídios, setas pretas finas

indicam conídios germinando, pretas grossas indicam formação de hifas. Barra de 10 μ m. #: $p < 0,05$ representam as diferenças estatísticas significativas em relação as mesmas condições em horas diferentes.

Foram realizados ensaios com presença do inibidor de actina Citocalasina D (2 μ M). Na condição de fagocitose (figura 9A) pode-se observar que há um maior número de conídios internalizados no tempo de 1 hora na ausência de citocalasina D, esta decresce no tempo de 4 horas, já com presença de citocalasina D tem-se que não há variação significativa no número de conídios internalizados. Já em relação a liberação (figura 9B) tem-se que na condição com citocalasina D apresenta uma baixa recuperação, em ambos os tempos, o que pode se fazer inferir no fato de que, na presença do inibidor de actina tem-se o efeito de uma menor liberação dos conídios no interior do fungo, demonstrando assim que se trata de uma exocitose dos conídios pela ameba, sendo esta dependente de actina.

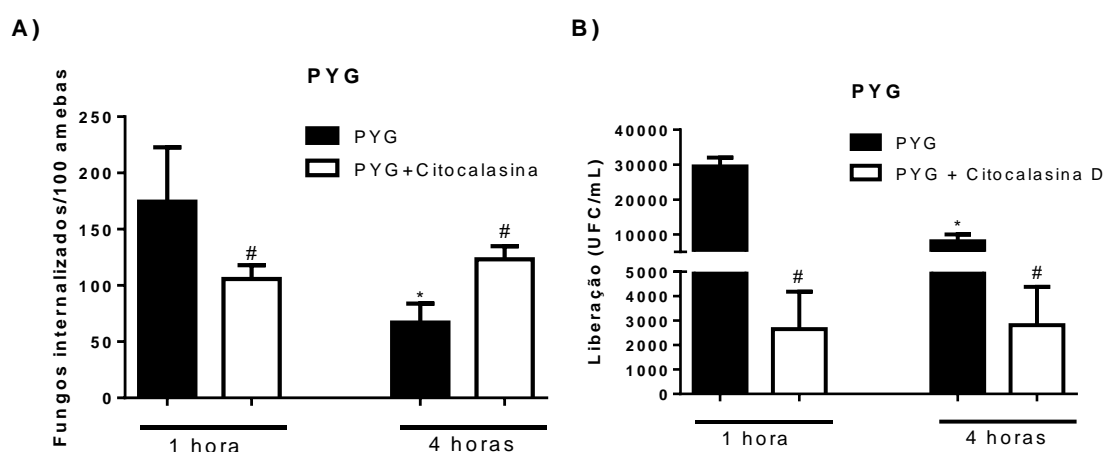


Figura 9 – Ensaio de fagocitose e liberação na presença de Citocalasina 2 μ M. A) Ensaio de fagocitose de PYG *Tr* por *Alx* em meio PYG com presença de citocalasina D. Foram contadas 100 amebas por hora e o número de conídios internalizados por essas amebas B) Ensaio de liberação de *Tr* por *Alx* no meio PYG com presença de citocalasina D. Os dados são expressos em CFU/mL. *: $p < 0,05$ entre diferentes tempos na mesma condição. #: $p < 0,05$ entre condições diferentes no mesmo tempo.

Foram realizados ensaios de fagocitose, atividade fungicida e liberação com o objetivo de verificar a influência dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} . Os resultados são apresentados na figura abaixo:

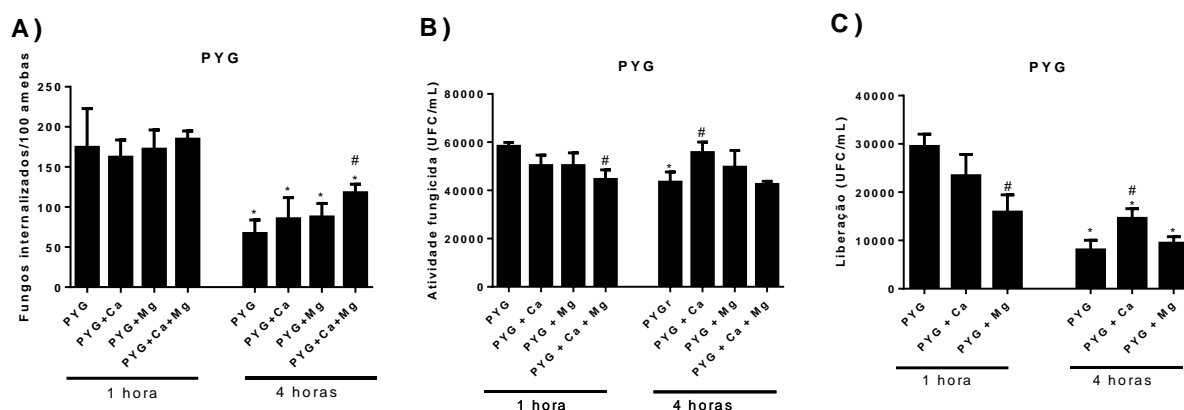


Figura 10 – Ensaio de fagocitose, atividade fungicida e liberação na condição PYG com adição dos íons divalentes Ca e Mg. A) Ensaio de fagocitose de PYG *Tr* por *Alx* em meio PYG com adição dos íons divalentes Ca e Mg. Foram contadas 100 amebas por hora e o número de conídios internalizados por essas amebas. B) Atividade fungicida do fungo *T. rubrum* pela ameba *A. castellanii* com adição dos íons divalentes Ca e Mg na condição PYG. C) Liberação de *Tr* por *Alx* em meio PYG com adição dos íons divalentes Ca e Mg. *: $p < 0,05$ entre diferentes tempos na mesma condição. #: $p < 0,05$ entre condições diferentes no mesmo tempo.

No ensaio de fagocitose (figura 10A) observa-se que no tempo de 1 hora não há diferenças entre as condições com presença dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} e o controle PYG, entretanto é possível observar que a condição com presença de ambos os íons apresentou um maior número de conídios internalizados que o controle no tempo de 4 horas. Em relação a atividade fungicida (figura 10B), no tempo de uma hora tem-se que na condição com presença de ambos os íons, *Alx* demonstrou maior capacidade de neutralizar *Tr* e que no tempo de 4 horas a condição com presença de Ca^{2+} apresentou menor atividade fungicida que o controle. Com relação a liberação, tem-se que houve menor recuperação de UFC/mL no tempo de uma hora na presença do íon Mg^{2+} e que no tempo de 4 horas, a condição com presença de Ca^{2+} apresentou maior recuperação de UFC/mL que o controle.

5.3 Influência da condição NA na interação entre *Tr* e *Alx*.

Foram realizados ensaios na condição Neff antes (NA) para se verificar a influência dessa condição na interação entre *A. castellanii* e *T. rubrum*

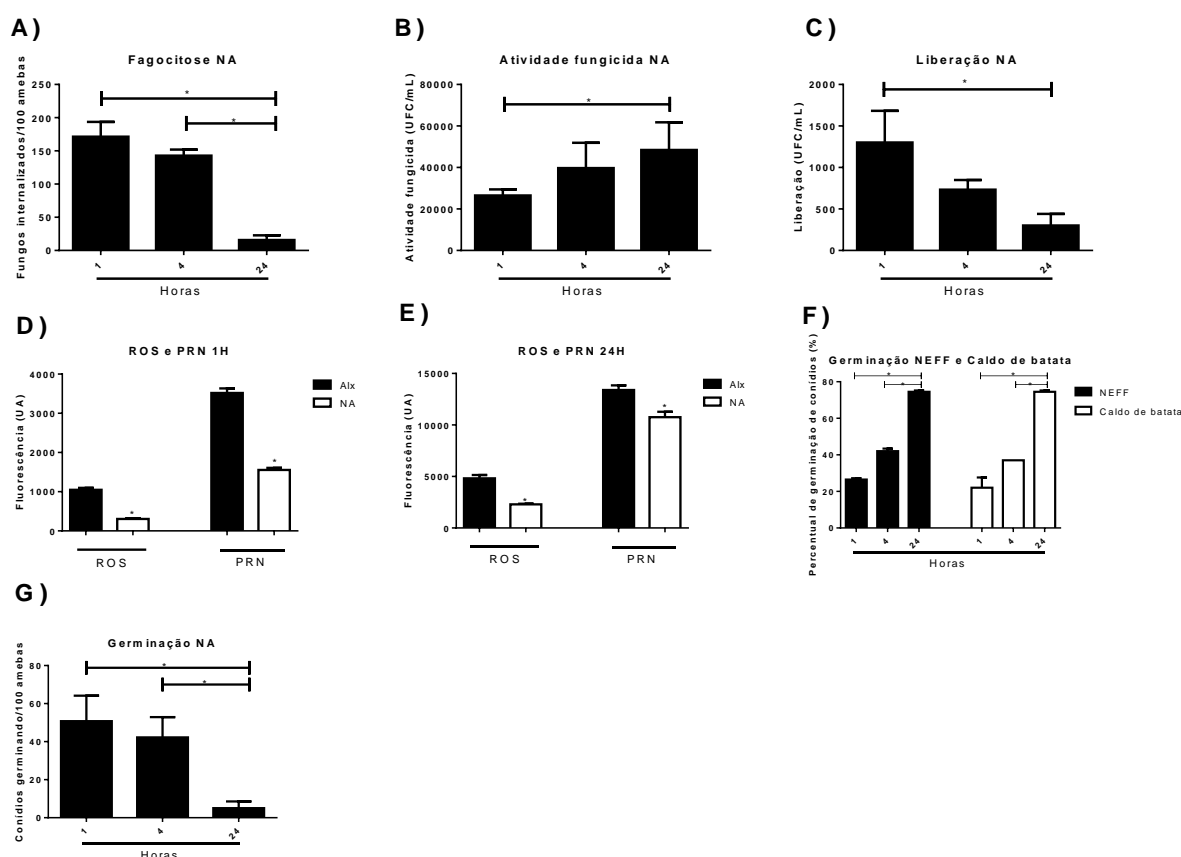


Figura 11 – Influência da condição NA na interação entre *Tr* e *Alx* - A) Ensaio de fagocitose de *Tr* por trofozoítos de *Alx* nas condições NA. Foram contadas 100 amebas por hora e o número de conídios internalizados por essas amebas. B) Ensaio de atividade fungicida de *Alx* contra *Tr*. Número de unidades formadoras de colônias recuperadas do interior de *Alx* nas condições NA. 1, 4 e 24 horas após infecção com *Tr*. C) Após uma hora de infecção, esporos extracelulares foram removidos e foi determinada taxa de liberação de esporos internalizados por cistos e trofozoítos das condições NA. D) Ensaio de produção de ROS e PRN nas condições *Alx* (controle sem fungo em NA), NA no tempo de 1 hora. E) Ensaio de produção de ROS e PRN nas condições *Alx* (controle sem fungo em NA), NA no tempo de 24 horas. F) Gráfico de percentagem de germinação de conídios de *T. rubrum* com o passar do tempo em meio NA e caldo de batata. G) Germinação de *T. rubrum* no interior de *A. castellanii* nas condições NA. *: $p < 0,05$ entre diferentes tempos na mesma condição. #: $p < 0,05$ entre condições diferentes no mesmo tempo.

O ensaio de fagocitose (figura 11A) na condição NA demonstrou que nas primeiras horas houve maior internalização de fungo (aproximadamente 175 fungos internalizados com 1 hora e 150 com 4 horas), havendo um grande decréscimo no tempo de 24 horas (aproximadamente 20 fungos internalizados). Com relação a atividade fungicida nessa condição (figura 11B) observa-se que se tende a haver uma maior recuperação de UFC/mL com o passar das horas, demonstrando uma menor eficácia na neutralização de *Tr*. O gráfico de liberação (figura 11C), concomitantemente com o a atividade fungicida, demonstra que de fato a liberação de fungos decresce com o tempo (havendo apenas aproximadamente 500 UFC/mL recuperadas com 24 horas).

Foram quantificadas a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por *A/x*, utilizando sondas específicas também nesta condição. O que se pode observar nas figuras 11D e E é que presença de salina Neff é reduzido significativamente a produção de ROS e PRN já na primeira hora após estímulo ($p < 0,05$).

Verificou-se também se *Tr* seria capaz de germinar em salina de Neff, em comparativo com caldo batata (figura 11F), onde se obteve que ambos os meios não apresentaram variação na taxa de germinação de *Tr*. Deste modo, verificamos então se *Tr* poderia também germinar no interior de *A/x* na condição NA (figura 11G). Verificou-se então que *Tr* apresenta capacidade de germinar no interior de *A/x* também nesta condição.

Foram então registradas imagens, através de microscopia óptica (figura 12), onde foram verificadas inclusive presença de hifas rompendo as células ameboides e também presença de amebas em sua forma de cisto.

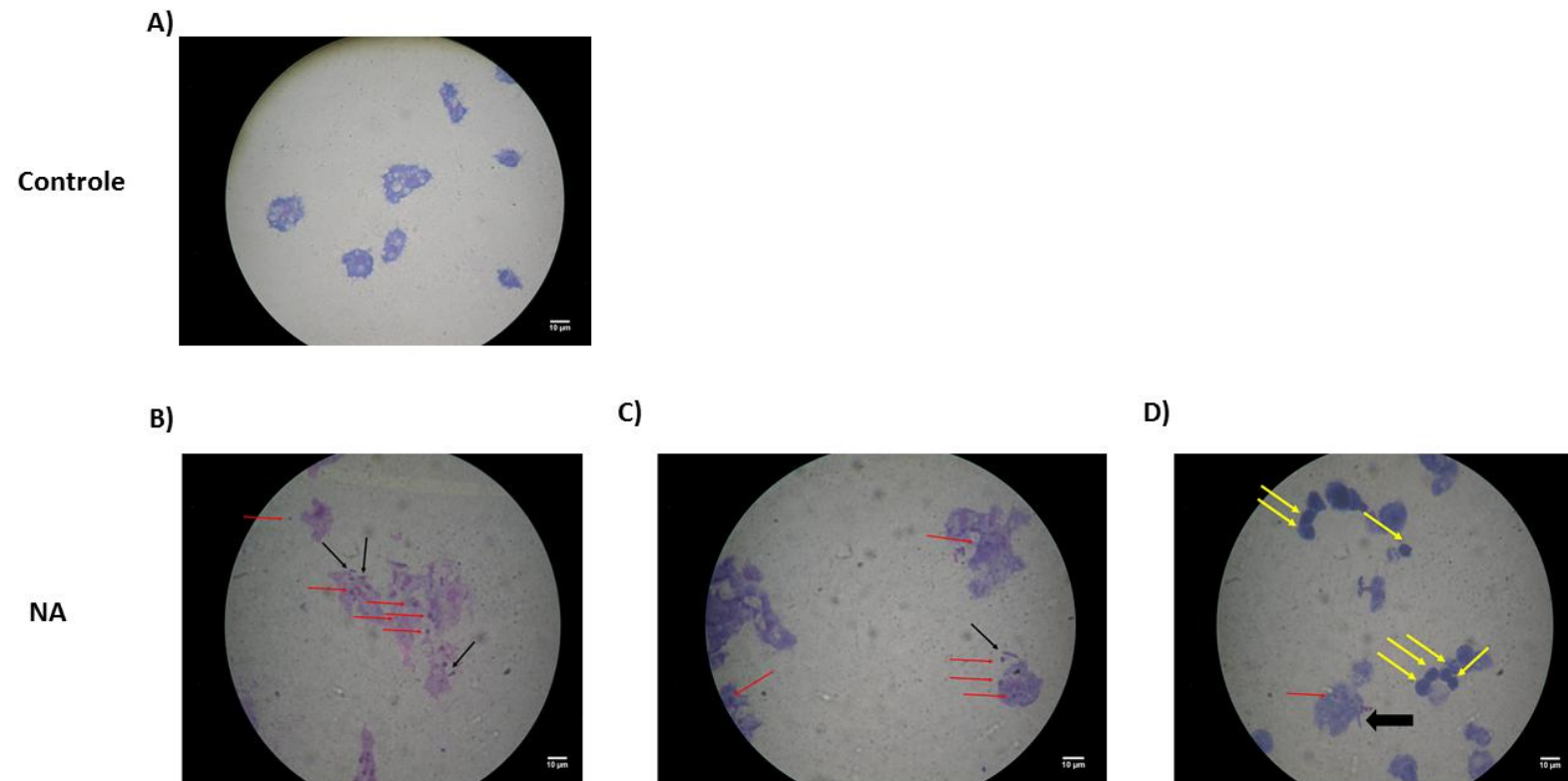


Figura 12 - Micrografia em 100x do ensaio de fagocitose com *A. castellanii* desafiado com *T. rubrum* na condição NA - (A) controle de *A. castellanii*; (B) NA com 1 hora; (C) NA com 4 horas; (D) NA com 24 horas. Setas vermelhas indicam conídios, setas pretas finas indicam conídios germinando, setas amarelas indicam cistos de *A. castellanii* e setas pretas grossas indicam formação de hifas. Barra de 10µm.

Sendo assim, foram realizados ensaios com presença de manose também na condição NA, esta na concentração de 1mM. Tem-se então que no ensaio de fagocitose (figura13A) a condição NA apresenta aproximadamente 122 conídios internalizados com uma hora, não havendo variação entre a presença de 1 mM de manose. Entretanto verifica-se que no tempo de 4 horas, a condição NA apresenta diferença significativa com NA 1 hora, tendo aproximadamente 50 conídios internalizados, mas outra vez não há diferença entre as condições com e sem manose. Em relação a atividade fungicida (figura 13B), tem-se que no tempo de uma hora, a condição com presença de manose apresenta um maior número UFC/mL recuperados quando comparada a condição sem manose (22000 UFC/mL e 14000 UFC/mL, respectivamente). No tempo de 4 horas tem-se que na condição com ausência de manose, aumentou-se o número de UFC/mL recuperadas, em contrapartida na presença de manose houve menor recuperação, demonstrando que a presença de manose aparentemente favorece a atividade fungicida de *A/x*. Com relação a liberação (figura 13C) o gráfico demonstra que na condição sem manose, há uma maior recuperação de UFC/mL, havendo diferença significativa em relação a presença de manose (20000 UFC/mL e 4000 UFC/mL, respectivamente), sendo que com o tempo de 4 horas não há variação estatística entre as condições (aproximadamente 2500 UFC/mL).

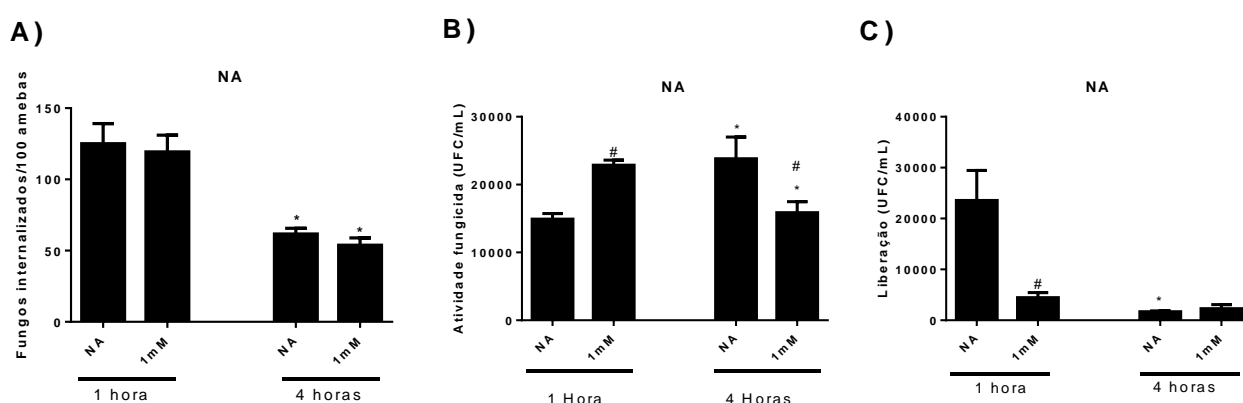


Figura 13 – Ensaio de fagocitose, atividade fungicida e liberação nas condições NA e NA com adição de 1mM de manose. A) Ensaio de fagocitose do fungo *T. rubrum* pela ameba *A. castellanii* na presença de 1 mM manose na condição NA. Foram contadas 100 amebas por

hora e o número de conídios internalizados por essas amebas. B) Atividade fungicida do fungo *T. rubrum* pela ameba *A. castellanii* na presença de manose (1 mM) na condição NA. C) Liberação de *Tr* por *Alx* na presença de manose na condição NA. *: $p < 0,05$ entre diferentes tempos na mesma condição. #: $p < 0,05$ entre condições diferentes no mesmo tempo.

Verificou-se também a capacidade de germinação de *Tr* no interior da ameba nas condições com presença de manose na condição NA. A condição NA (figura 14) apresenta diferença entre o número de conídios internalizados entre 1 e 4 horas em todas a condição com presença de manose. Também há diferença em NA no número de germinação no controle sem manose com 1 e 4 horas. Com relação a hifas em NA, há diferença estatística em todas as condições entre os tempos de 1 e 4 horas.

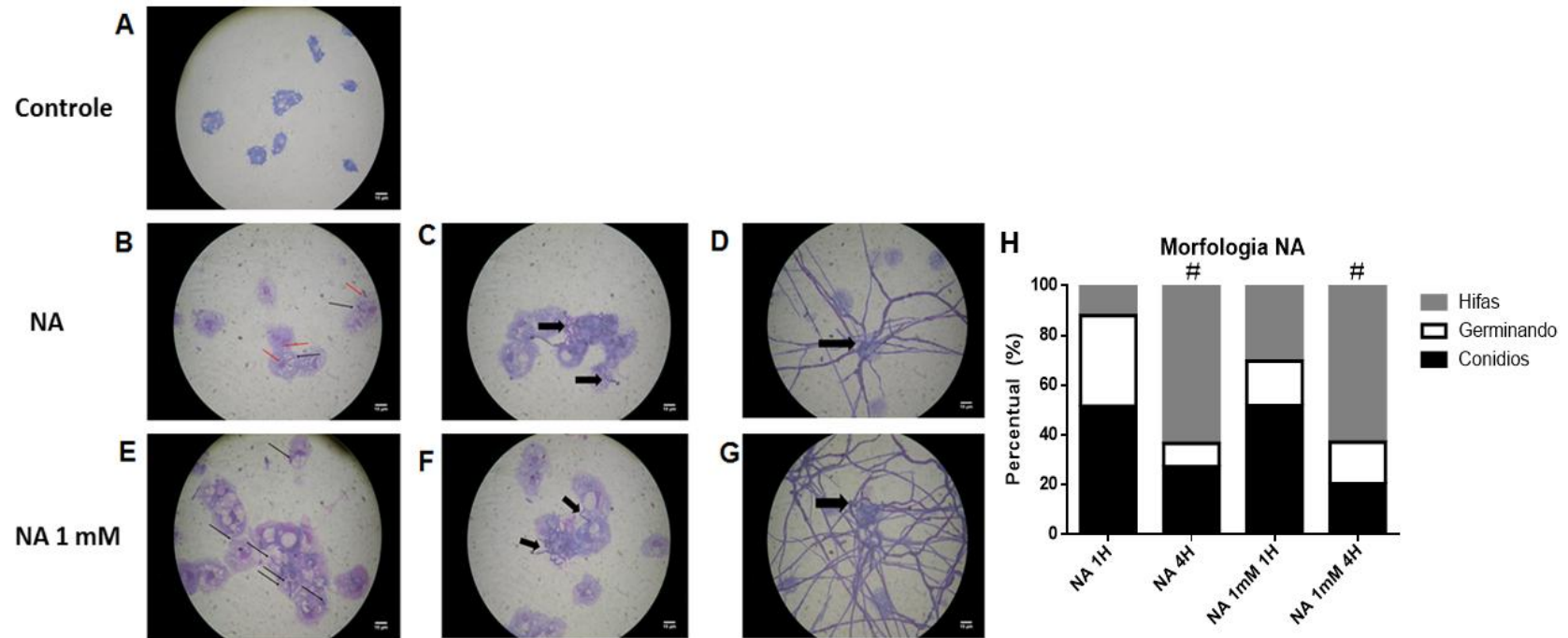


Figura 14. Micrografia em 100x do ensaio de fagocitose com *A. castellanii* desafiado com *T. rubrum* e gráfico de germinação de NA com presença de manose: nas condições NA sem manose e com 1 mM e 10 mM de manose (A) controle de *A. castellanii*; (B) NA com 1 hora; (C) NA com 4 horas; (D) NA com 24 horas; (E) NA 1 mM com 1 hora; (F) NA 1mM com 4 horas; (G) NA 1 mM com 24 horas; (H) percentual de conídios, fungos germinando e hifas no

interior de *A. castellanii* na condição NA com presença de 1mM manose. Setas vermelhas indicam conídios, setas pretas finas indicam conídios germinando, pretas grossas indicam formação de hifas. Barra de 10 μ m. #: $p < 0,05$ representam as diferenças estatísticas significativas em relação as mesmas condições em horas diferentes.

Foram realizados ensaios de fagocitose, atividade fungicida e liberação com o objetivo de verificar a influência dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} . Os resultados são apresentados na figura abaixo:

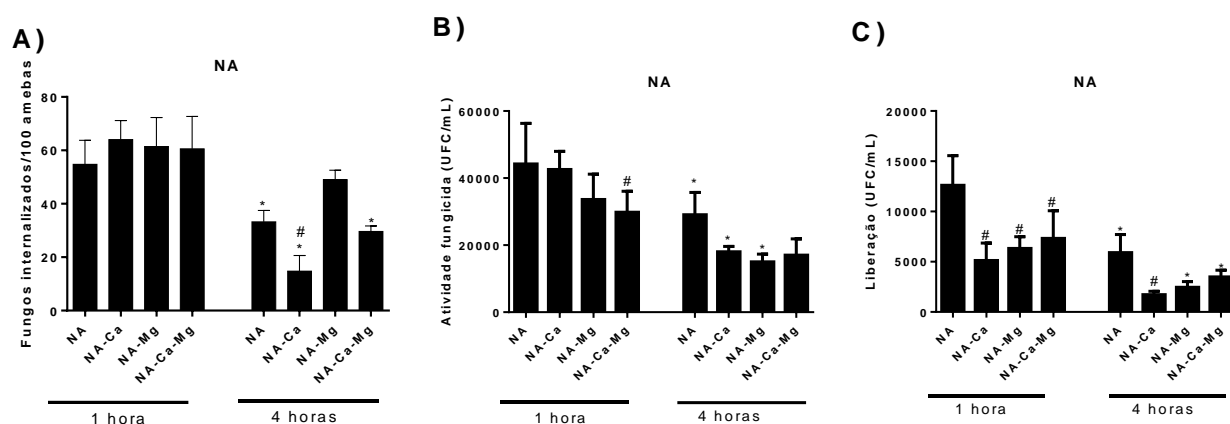


Figura 15 – Ensaios de fagocitose, atividade fungicida e liberação na condição NA com ausência dos íons divalentes Ca e Mg. A) Ensaio de fagocitose de NA *Tr* por *Alx* em meio NA com ausência dos íons divalentes Ca e Mg. Foram contadas 100 amebas por hora e o número de conídios internalizados por essas amebas. B) Atividade fungicida do fungo *T. rubrum* pela ameba *A. castellanii* com ausência dos íons divalentes Ca e Mg na condição NA. C) Liberação de *Tr* por *Alx* na condição NA com ausência dos íons divalentes Ca e Mg. *: $p < 0,05$ entre diferentes tempos na mesma condição. #: $p < 0,05$ entre condições diferentes no mesmo tempo.

Pode-se observar no ensaio de fagocitose (figura 15A) que no tempo de uma hora não há variação entre NA e as demais condições com ausência dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} ou de ambos. Já no tempo de quatro horas verifica-se que a condição NA- Ca^{2+} apresenta um menor número de conídios em seu interior em relação ao controle NA e que a condição NA- Mg^{2+} não apresentou diferença estatística entre o tempo de 1 hora. Com relação à atividade fungicida, a condição com ausência de ambos os íons apresentou uma maior atividade

fungicida em relação ao controle NA no tempo de uma hora, não diferenciando estatisticamente no tempo de 4 horas. Com relação a liberação, tem-se que a condição controle (NA) apresentou uma maior recuperação de UFC/mL que as demais condições no tempo de uma hora. No tempo de 4 horas a condição NA-Ca²⁺ apresentou menor recuperação de UFC/mL que o controle NA.

5.4 Influência da condição ND na interação entre *Tr* e *Alx*.

Foram realizados ensaios na condição Neff depois (ND) para se verificar também a influência dessa condição na interação entre *A. castellanii* e *T. rubrum*.

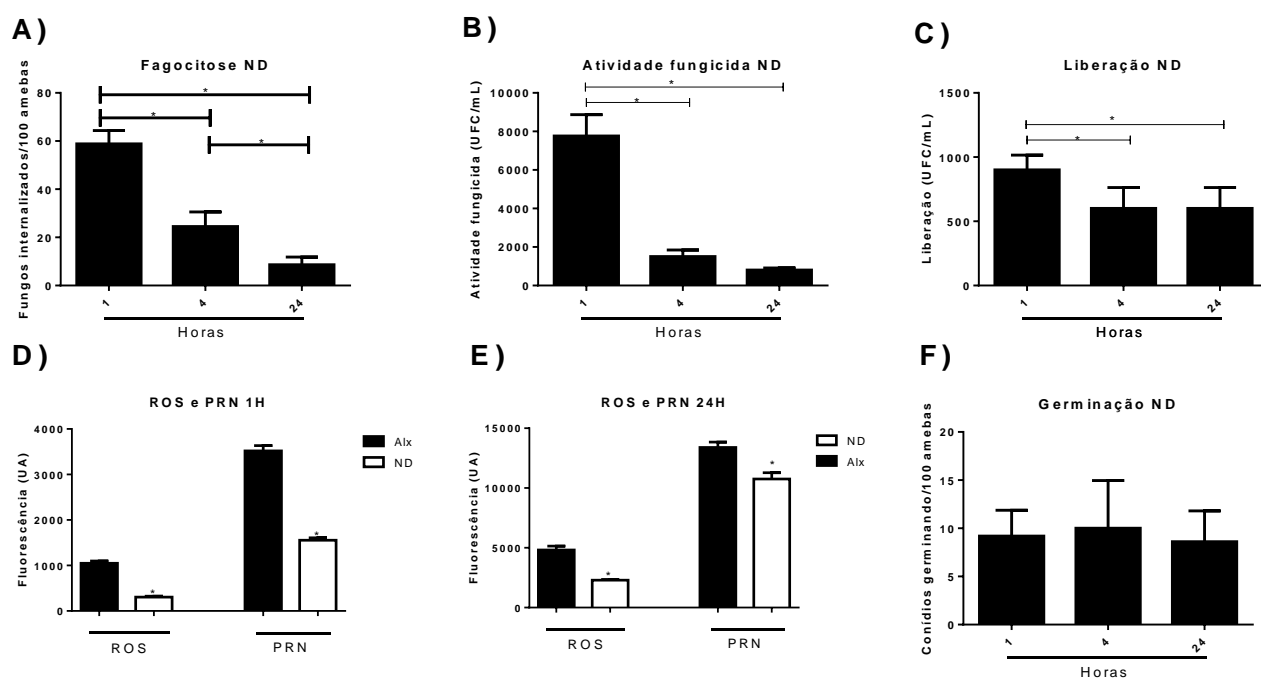


Figura 16 – Influência da condição ND na interação entre *Tr* e *Alx* - A) Ensaio de fagocitose de *Tr* por trofozoítos de *Alx* nas condições ND. Foram contadas 100 amebas por hora e o número de conídios internalizados por essas amebas. **B)** Ensaio de atividade fungicida de *Alx* contra *Tr*. Número de unidades formadoras de colônias recuperadas do interior de *Alx* nas condições ND. 1, 4 e 24 horas após infecção com *Tr*. **C)** Após uma hora de infecção, esporos extracelulares foram removidos e foi determinada taxa de liberação de esporos internalizados por cistos e trofozoítos das condições ND. **D)** Ensaio de produção de ROS e PRN nas

condições *Alx* (controle sem fungo em ND), ND no tempo de 1 hora. E) Ensaio de produção de ROS e PRN nas condições *Alx* (controle sem fungo em NA), NA no tempo de 24 horas. F) Germinação de *T. rubrum* no interior de *A. castellanii* nas condições ND. *: $p < 0,05$ entre diferentes tempos na mesma condição. #: $p < 0,05$ entre condições diferentes no mesmo tempo.

No ensaio de fagocitose (figura 16A) é possível observar que na primeira hora há um maior número de conídios de *Tr* internalizados por *Alx* (aproximadamente 60 conídios), diminuindo com o tempo de experimento (aproximadamente 10 conídios em 24 horas). O ensaio de atividade fungicida (figura 16B) demonstra que com o passar das horas, a eficácia de *Alx* em neutralizar o *Tr* aumenta, visto que na primeira hora tem-se a recuperação de aproximadamente 8000 UFC/mL e em 24 horas tem-se aproximadamente 1000 UFC/mL. Já a liberação (figura 16C) apresenta-se maior em uma hora (aproximadamente 1000 UFC/mL) e constante em 4 e 24 horas (aproximadamente 500 UFC/mL).

A produção espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por *Alx*, utilizando sondas específicas, também foi realizada na condição ND. As figuras 16D e E demonstram que na infecção com *Tr* na condição ND, há também o aumento na produção de PRN por *Alx* 1 e 24 horas após infecção ($p < 0,05$), entretanto o controle apresenta maior produção destas espécies reativas em comparação a ND.

Verificou-se também a capacidade de *Tr* germinar no interior de *Alx* nesta condição (figura 16F), onde se verificou que o fungo germina no interior da ameba e que a taxa de germinação se demonstrou constante com o tempo.

Foram então registradas imagens, através de microscopia óptica (figura 17), onde foram verificadas inclusive presença de hifas rompendo as células ameboides.

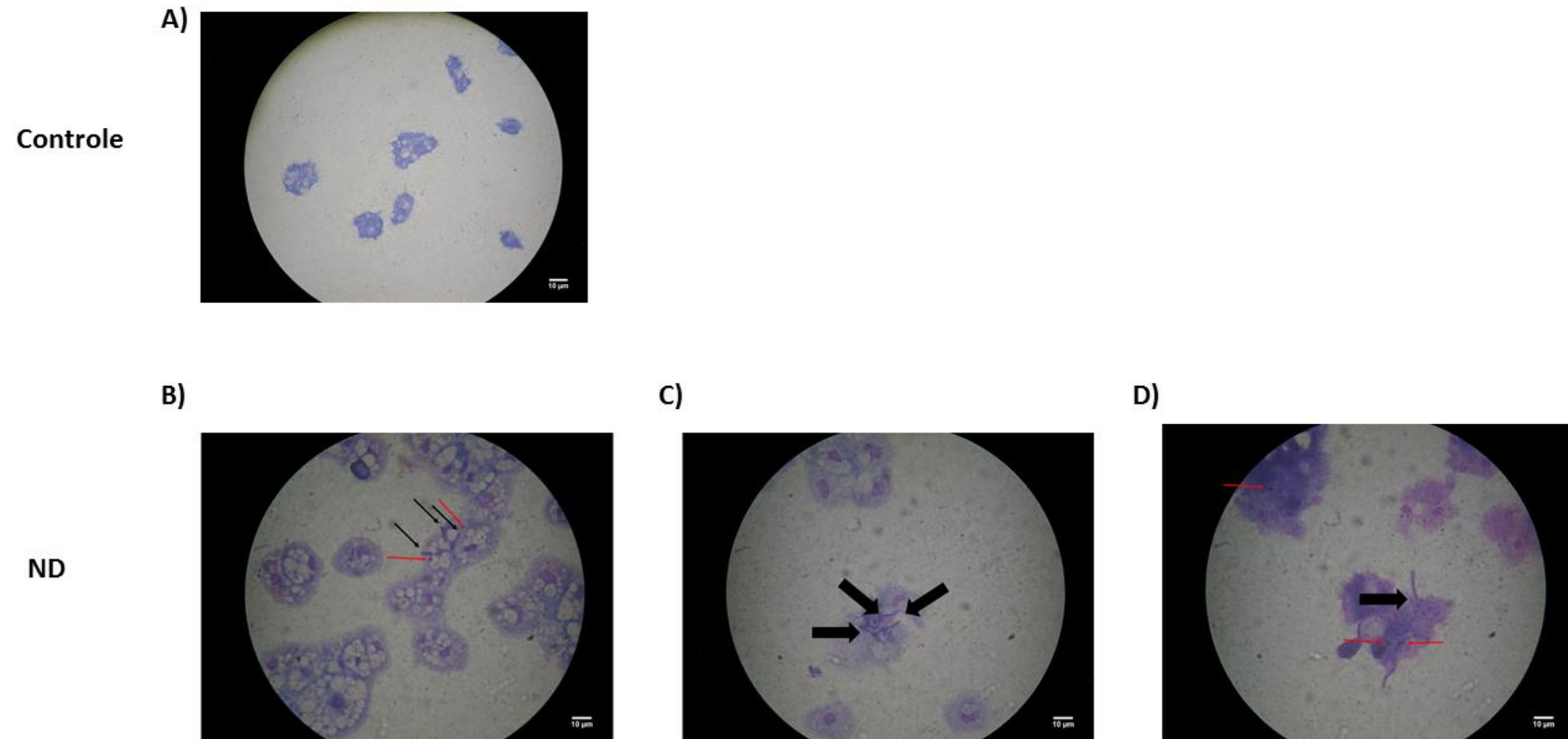


Figura 17 - Micrografia em 100x do ensaio de fagocitose com *A. castellanii* desafiado com *T. rubrum* na condição ND - (A) controle de *A. castellanii*; (B) ND com 1 hora; (C) ND com 4 horas; (D) ND com 24 horas. Setas vermelhas indicam conídios, setas pretas finas indicam conídios germinando, setas amarelas indicam cistos de *A. castellanii* e setas pretas grossas indicam formação de hifas. Barra de 10µm.

Foram então realizados ensaios com presença de manose também na condição ND, na concentração de 1mM. Os resultados apresentados abaixo:

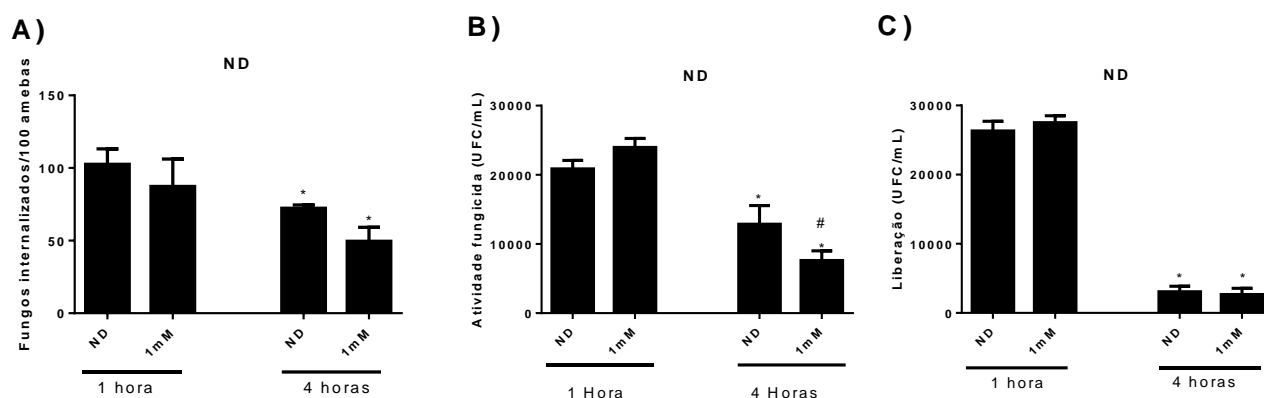


Figura 18 – Ensaios de fagocitose, atividade fungicida e liberação nas condições ND e ND com adição de 1mM de manose. A) Ensaio de fagocitose do fungo *T. rubrum* pela ameba *A. castellanii* na presença de 1 mM manose na condição ND. Foram contadas 100 amebas por hora e o número de conídios internalizados por essas amebas. B) Atividade fungicida do fungo *T. rubrum* pela ameba *A. castellanii* na presença de manose (1 mM) na condição ND. C) Liberação de *Tr* por *Alx* na presença de manose na condição ND. *: $p < 0,05$ entre diferentes tempos na mesma condição. #: $p < 0,05$ entre condições diferentes no mesmo tempo.

O ensaio de fagocitose de ND em presença e ausência de manose (figura 18A) demonstra que não há alteração significativa em ambos os tempos (1 e 4 horas), tendo aproximadamente 100 conídios internalizados no tempo de 1 hora e aproximadamente 60 no tempo de 4 horas. Em relação a atividade fungicida (figura 18B), no tempo de 4 horas a presença de manose faz com que *Alx* se torne mais eficaz na inviabilização de *Tr* em relação ao controle sem manose. Já a liberação (figura 18C) não apresenta diferença estatística entre as duas condições.

Na condição ND há diferença estatística em todas as condições com relação a número de conídios internalizados e hifas entre os tempos de 1 e 4 horas (figura 19).

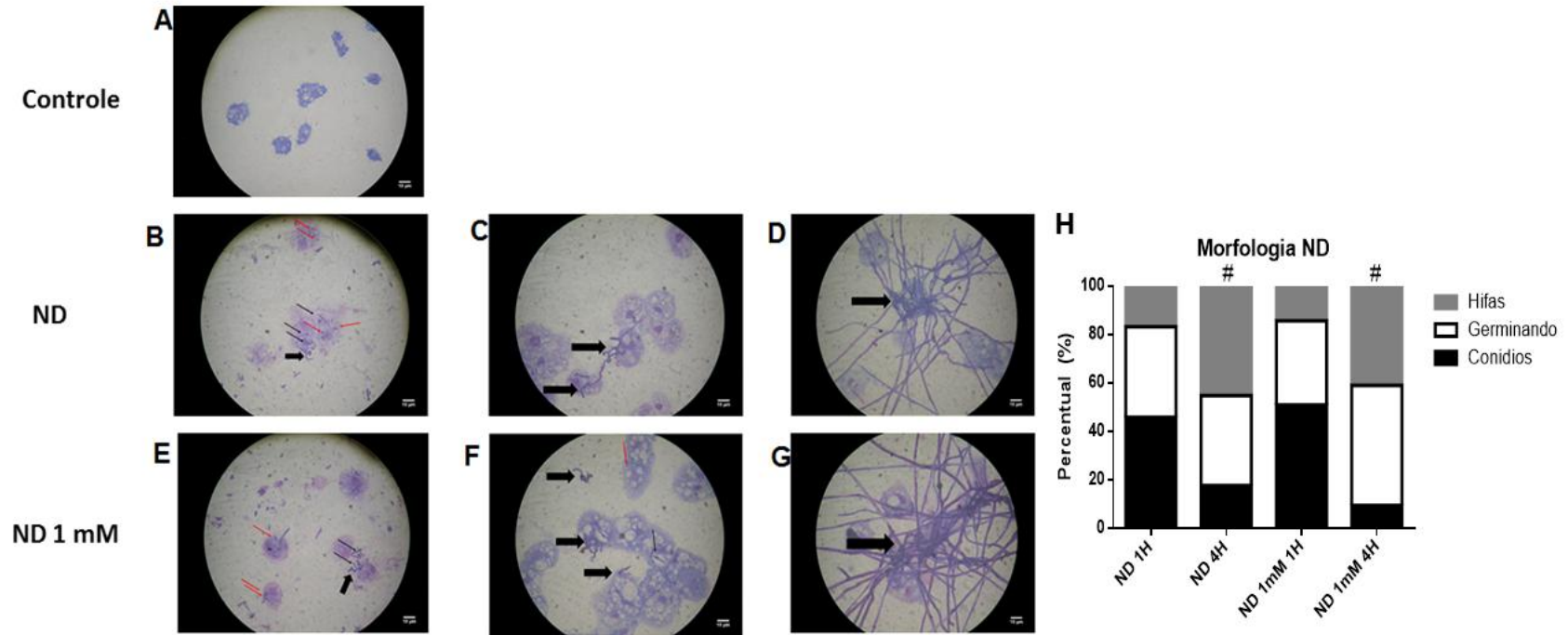


Figura 19. Micrografia em 100x do ensaio de fagocitose com *A. castellanii* desafiado com *T. rubrum* e gráfico de germinação de ND com presença de manose: nas condições ND sem manose e com 1 mM e 10 mM de manose (A) controle de *A. castellanii*; (B) ND com 1 hora; (C) ND com 4 horas; (D) ND com 24 horas; (E) ND 1 mM com 1 hora; (F) ND 1mM com 4 horas; (G) ND 1 mM com 24 horas; (H) percentual de conídios, fungos germinando e hifas no

interior de *A. castellanii* na condição ND com presença de 1mM de manose. Setas vermelhas indicam conídios, setas pretas finas indicam conídios germinando, pretas grossas indicam formação de hifas. Barra de 10 μ m. #: $p < 0,05$ representam as diferenças estatísticas significativas em relação as mesmas condições em horas diferentes.

Ensaio de fagocitose, atividade fungicida e liberação foram realizados com o objetivo de verificar a influência dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} . Os resultados são apresentados na figura abaixo:

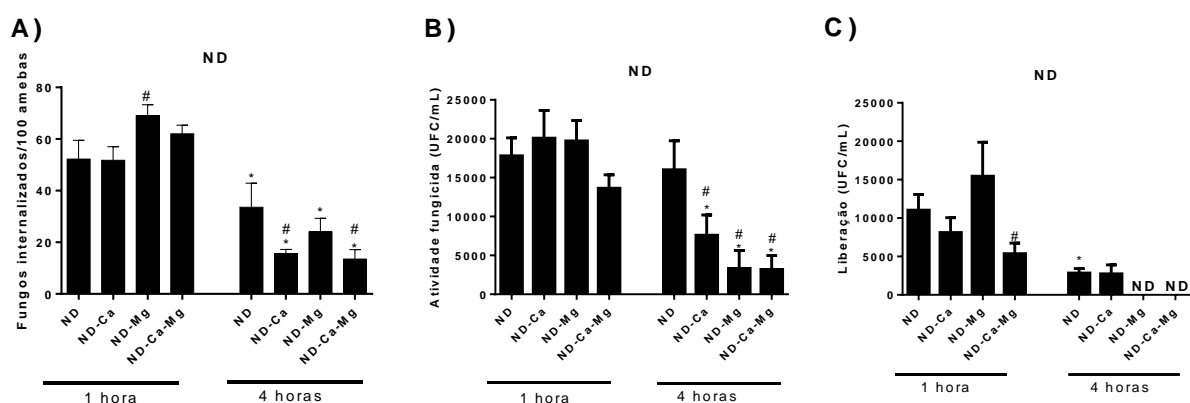


Figura 20 – Ensaio de fagocitose, atividade fungicida e liberação na condição ND com ausência dos íons divalentes Ca e Mg. A) Ensaio de fagocitose de ND *Tr* por *Alx* em meio ND com ausência dos íons divalentes Ca e Mg. Foram contadas 100 amebas por hora e o número de conídios internalizados por essas amebas. B) Atividade fungicida do fungo *T. rubrum* pela ameba *A. castellanii* com ausência dos íons divalentes Ca e Mg na condição ND. C) Liberação de *Tr* por *Alx* na condição ND com ausência dos íons divalentes Ca e Mg. *: $p < 0,05$ entre diferentes tempos na mesma condição. #: $p < 0,05$ entre condições diferentes no mesmo tempo.

Com relação a fagocitose (figura 20A) pode-se verificar que no tempo de uma hora a ausência do íon Mg^{2+} fez com que a ameba internalizasse mais conídios de *Tr* que o controle. Já no tempo de 4 horas a ausência de Ca^{2+} e de ambos os íons diminui a internalização de conídios em relação ao controle. Em relação a atividade fungicida (figura 20B), no tempo de uma hora, a ausência dos íons não alterou significativamente em relação ao controle, entretanto no tempo de 4 horas, todas as condições sem um ou ambos os íons apresentaram uma maior capacidade de inviabilizar o fungo, havendo uma menor recuperação de UFC/mL que o controle. O ensaio de liberação demonstrou que

no tempo de uma hora, a condição sem ambos os íons apresentou uma menor liberação que o controle. Já no tempo de 4 horas a condição sem Mg^{2+} e sem ambos os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} não apresentaram não número de colônias detectáveis.

5.5 Teste de sensibilidade a antifúngicos

Foi realizado também teste de sensibilidade à antifúngicos. O teste de sensibilidade à antifúngicos apresentou os seguintes resultados:

Tabela 1 – CIM do fungo *T. rubrum* recuperado de *Acanthamoeba castellanii* em diferentes condições experimentais. Valores das concentrações inibitórias mínimas baseadas nos valores encontrados por Santos & Hamdan (2007) (ITZ = itraconazol; CTZ = cetoconazol; TERB = terbinafina).

Linhagem	ITZ (CIM₁₀₀)	CTZ (CIM₅₀)	TERB (CIM₁₀₀)
<i>T. rubrum</i> 28189	0,5	0,5	0,01
<i>T. rubrum</i> PYG 1 h	0,06	0,5	0,03
<i>T. rubrum</i> PYG 4 h	0,25	0,5	0,03
<i>T. rubrum</i> PYG 24 h	0,125	0,5	0,01
<i>T. rubrum</i> ND 1 h	0,25	0,5	0,03
<i>T. rubrum</i> ND 4 h	0,125	0,5	0,01
<i>T. rubrum</i> ND 24 h	0,125	0,5	0,03
<i>T. rubrum</i> NA 1 h	0,25	0,5	0,01
<i>T. rubrum</i> NA 4 h	0,25	0,5	0,01
<i>T. rubrum</i> NA 24 h	0,06	0,5	0,01

Para o antifúngico itraconazol, quando comparados ao controle, na condição sem Neff, tem-se que no tempo de uma hora há uma redução na CIM, de oito vezes, e no tempo de vinte e quatro horas, reduz quatro vezes. Para infecção antes de acréscimo de meio para encistamento, o no tempo de quatro e vinte e quatro horas a uma redução de quatro vezes da CIM e

na condição que força o encistamento, no tempo de vinte e quatro horas a uma redução de oito vezes da CIM. Com relação a cetoconazol e terbinafina, não há diferenças significativas com relação ao controle.

6 Discussão

Não há na literatura estudos de interação entre *A. castellanii* com *T. rubrum* ou nenhum fungo dermatófito. Existem outros estudos com outros fungos, como por exemplo: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*.

A eficácia de encistamento em NA que obtivemos em nosso estudo foi de aproximadamente 25% e 30% (sem a presença *T. rubrum* e com a presença de *T. rubrum*, respectivamente) no tempo de 24 horas. No estudo realizado por Neff *et al.* (1964), os autores obtiveram aproximadamente 20% de células na forma de cisto maduro em 15 horas.

Nossos dados de fagocitose demonstram que, na proporção de 1 ameba:5 células fungicas, na condição Neff, que força o encistamento da ameba, ela apresenta um maior índice de internalização e germinação no tempo de uma hora (aproximadamente 170 células internalizadas/ 100 amebas). Já na condição com meio PYG, no tempo de 1 hora, a taxa fagocítica é de aproximadamente 100 conídios/ 100 amebas. Sendo que, PYG é um meio ideal para cultivo de *A. castellanii*, esse pode ser um provável motivo para que, no meio de estresse essa ameba tente internalizar um maior número de conídio, como um meio de escape nutricional, endocitando mais conídios do fungo. Ainda NA, é possível observar uma maior germinação de *T. rubrum* na primeira hora que em PYG (aproximadamente 60 e 10 conídios, respectivamente) esse fato pode se dar devido a presença de dois íons divalentes essenciais para o encistamento de *A. castellanii*: Ca^{2+} e Mg^{2+} . Ambos são cofatores enzimáticos e Mg^{2+} também têm importante papel em membranas e ribossomos. Com o decorrer das horas os papéis se invertem, havendo maior número de 30 conídios em PYG e 5 conídios em NA, no interior das amebas. O que pode se explicar pelo menor número de trofozoitos.

Os dados deste trabalho também demonstram que, devido ao fato de que em meio Neff há um maior número de células encistadas, tem-se que mais fungo extracelular pode ser internalizado, aumentando assim o índice fagocítico e menor atividade fungicida, o contrário das condições ND e NA, onde há mais trofozoítos, tendo assim um menor índice fagocítico, maior atividade fungicida.

Os estudos de Chrisman *et al.* (2010), em seus estudos de fagocitose, testaram oito cepas de *C. neoformans* contra *A. castellanii*, e observaram uma taxa de fagocitose variando entre 25 e 10 células fagocitadas (1 célula fúngica:1 ameba) no tempo de 24 horas. Eles observaram que, após indução de capsula em *C. neoformans*, há um menor índice fagocítico, variando de 2 até 7 células.

Van Waeyenberghe, *et al.* (2013), estudaram a interação de *A. fumigatus* com *A. castellanii*, com proporção de 2 conídios:2 amebas, onde obtiveram como dados índice fagocítico semelhante ao obtidos em macrófagos respiratórios de pombos (Van Waeyenberghe, *et al.*, 2012), onde obtiveram no tempo de uma hora aproximadamente 25% +/- 1 foram fagocitados, e que 16% +/-6 foram mortos com 4 horas.

Bidochka et al. (2010), desafiaram os fungos *Metarhizium anisoplae* e *Beauveria bassiana* contra *A. castellanii*, na proporção de 1 célula fúngica:1 ameba, onde obtiveram no tempo de horas, a porcentagem de amebas contendo fungo onde 30% de *A. castellanii* continha *M. anisoplae* e 28% continham *B. bassiana*.

No ensaio de fagocitose com presença de manose, é possível observar que com o decorrer das horas, nas condições em presença de meio Neff, na condição sem manose e com a menor concentração de manose (1 mM) se comportam de maneira semelhantes, entretanto na concentração de 10 mM de manose, há um aumento na taxa de internalização de conídios, não havendo diferença entre os tempos de 1 e 4 horas. Já na condição PYG, ideal para o crescimento da ameba, tem-se que com o aumento da concentração de manose e diminui a fagocitose, o que é de se esperar, visto que a saturação dos receptores de manose por competição no meio interfere na interação dos dermatófitos com a ameba (ALLEN & DAWIDOWICZ, 1990).

Yoo e Jung (2012), testaram a capacidade de fagocitose de *A. castellanii* contra *Escherichia coli* K12, demonstrando que, contra a bactéria, a ameba saturada com manose obteve uma menor taxa de fagocitose (0,019% e 0,03% respectivamente). Os autores também encontraram em amebas tratadas com manose, vacúolos gigantes, quando comparados ao controle. Esses vacúolos gigantes também foram encontrados em nossos experimentos.

Rodrigues *et al.* (2015) demonstraram que *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (AMPV) na presença de manose nas concentrações de 10 e 25 µg/mL não altera diferença nas titulações virais, entretanto com 50 µg/mL a redução de 10 vezes, se mantendo esse padrão com 100 e 125 µg/mL, onde concluíram que a ligação de APMV com *A. castellanii* pode ser inibida competitivamente pela manose.

Os dados do ensaio de atividade fungicida observados em nosso trabalho, demonstram uma maior recuperação na condição NA sem manose, sendo que a recuperação aumenta com o passar das horas, na ordem de aproximadamente 40000 UFC/mL no tempo de 24 horas. Esses dados concordam com o fato de que há uma maior internalização de conídios na condição Neff e com a menor produção de ROS e PRN nesse meio. Isso pode se explicar devido a dois importantes componentes da salina de Neff: Mg²⁺ e Ca²⁺. Fu e Casadevall (2018) demonstraram em seus estudos que a presença desses dois cátions bivalentes potencializa a capacidade de *A. castellanii* fagocitar *Cryptococcus neoformans*. Os autores demonstram que a presença desses íons no meio favorece a adesão de *A. castellanii*, além de que as amebas se moveram assim e entraram em contato com mais *C. neoformans*, o que foi traduzido em uma maior fagocitose.

Os dados apresentados neste trabalho sobre citocalasina D corroboram com os apresentados por Chisman, Alvarez e Casadevall (2010), onde estes autores testaram o efeito de citocalasina D na liberação de *C. neoformans* por *A. castellanii*, tendo demonstrado que, a citocalasina D à 2 µM não afeta a viabilidade da ameba, entretanto diminui sua motilidade, e, neste experimento, não houve observação de eventos de liberação.

Temos na condição NA que, a visualização em conjunto dos dados de *killing* e *release* demonstram um espelhamento: onde se recupera uma maior carga fungica através da atividade fungicida encontra-se uma menor exocitose da ameba (liberação). A soma desses dados nos leva a hipotetizar o fato de que a ameba pode estar encistando com conídios em seu interior, evento que foi reportado por Van der Henst *et al.* (2016), onde, demonstrando a interação entre *A. castellanii* e *Vibrio cholerae*, observaram que *V. cholerae* pode resistir à morte intracelular, sendo que as bactérias não digeridas foram exocitadas ou, de modo alternativo, estabeleceram um nicho de replicação dentro do vacúolo contrátil de ameba, permanecendo nesse compartimento mesmo no momento do encistamento.

Nossos dados demonstram que no tempo de 24 horas em todas as condições testadas, o fungo no interior da ameba apresenta capacidade de germinar e formar hifas, lisando assim a ameba. Entretanto no tempo de 1 hora é possível observar germinação de *T. rubrum* no interior de *A. castellanii* e hifas com tempo de 4 horas. Van Waeyenberghe *et al.* (2013) demonstram em seus estudos a capacidade *Aspergillus fumigatus* germinar no interior de *A. castellanii* (tempo de 16 horas) denominando este evento como possível mecanismo de evasão. Os mesmos autores mostram esse evento ocorrendo na interação entre *A. fumigatus* e macrófagos respiratórios de pombos, onde o fungo germina no interior desses macrófagos (evento observado com 6 horas) como possível mecanismo de evasão (VAN WAEYENBERGHE *et al.*, 2012). Yoshikawa *et al.* (2016) demonstram em seus estudos germinação de *T. rubrum* no interior de macrófagos J774, onde há a presença de hifas sucumbindo os macrófagos no tempo de 10 horas. Dada a importância da necessidade de germinação rápida do fungo quando em contato com humanos, que é de aproximadamente 3-4 horas entre o primeiro contato do artroconídio e do estrato córneo (PERES *et al.*, 2010) é possível que a ligeira germinação e formação de hifas de *T. rubrum* se dê para escape do sistema imune de hospedeiros humanos, dificultando a fagocitose pelo tamanho da hifa.

Yoshikawa *et al.* (2016) demonstraram que células da linhagem J774 se comportam de maneira semelhante a macrófagos residentes ou derivados de

medula óssea (BMDM), sendo capazes de realizar fagocitose e apresentando ciclo replicativo comparável a células primárias, apresentando perfil semelhante quando desafiados por *T. rubrum*. Os conídios de *T. rubrum* fagocitados se convertem rapidamente em hifas, destruindo as células J774, indicando que estas células se comportam de forma semelhante aos modelos *ex vivo* como macrófagos residentes ou BMDMs. Campos *et al.* (2006), demonstraram em seus estudos com interações de macrófagos residentes com *T. rubrum*, que, os conídios do fungo com esses macrófagos resultam na produção de TNF- α e IL-10, mas não de IL-12 e óxido nítrico (NO). Foi observado também que os macrófagos infectados regularam negativamente a expressão de moléculas co-estimulatórias, como CD80 ou CD54. Nesse estudo, os autores também demonstraram que a fagocitose dos conídios de *T. rubrum* é inibida pela adição de exoantígenos fúngicos ou manana. Após a fagocitose de conídios, a viabilidade dos macrófagos diminuiu drasticamente, sendo que os conídios ingeridos crescem e se diferenciam em hifas no interior dos macrófagos, resultando na ruptura da membrana dos macrófagos e posterior morte celular.

Baltazar *et al.* (2014), infectaram camundongos C57BL/6 (selvagens) e camundongos deficientes para IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) ou interleucina-12p40 (IL-12 $^{-/-}$), e demonstraram que, comparados ao grupo não infectado, os camundongos selvagens apresentaram maiores níveis de IFN- γ no 14 dia de infecção por *T. rubrum*, e que ambos os nocautes (IFN- $\gamma^{-/-}$ e IL-12 $^{-/-}$) apresentaram uma maior carga fungica no dia 7 após infecção.

Gasparto *et al.* (2014), testaram a influência de 2- (benzilidenoamino) fenol (3A3), itraconazol ou a combinação dos dois medicamentos, na fagocitose de *T. rubrum* por macrófagos intraperitoniais. Os resultados demonstraram que o índice fagocítico de foi aumentado 3,14 vezes com conídios tratados com 3A3 em comparação a conídios não tratados, 2,98 vezes com conídios tratados com itraconazol e 3,24 vezes com a combinação entre os dois medicamentos. Após 6 horas houve um aumento no índice fagocítico de 1,72 vezes para os grupos 3A3 e combinação, mas não houve diferença significativa entre controle e grupo tratado com itraconazol. Estes resultados demonstram que 3A3 pode

ser capaz de romper a estrutura superficial do fungo, aumentando assim a exposição de seus antígenos, que são reconhecidos pelos macrófagos.

Yoshikawa, Ferreira e Almeida (2015), estudaram a interação entre *T. rubrum* e BMDM a fim de avaliar o papel de inflamassomas na resposta entre ambos. BMDMs são capazes de fagocitar conídios de *T. rubrum*, entretanto são suscetíveis ao desenvolvimento de hifas, que levaram a destruição destes macrófagos. Santiago *et al.* (2014), estudaram qual o destino dos conídios de *T. rubrum* após serem captados por macrófagos e células dendríticas de humanos. Após a interação, o fungo se diferenciou em hifa nos macrófagos, diferente de CD, onde o fungo não foi capaz de se diferenciar em hifa. Os ensaios de citotoxicidade revelaram que a viabilidade dos macrófagos decaiu com o passar das horas, sendo que, após 10 horas a maioria dos macrófagos estavam inviáveis. Por outro lado, CDs não haviam sido afetadas pelo fungo, mesmo após 10 horas, permanecendo viáveis. Para se verificar a participação dos receptores de manose e DC-SIGN na fagocitose, CDs e macrófagos foram incubados com anti-CD206 e CD-209 durante 30 minutos e após esse período foram adicionados conídios de *T. rubrum*. Foi observado um menor índice fagocítico de conídio por células dendríticas quando os receptores de manana foram bloqueados.

Com relação a CIM, os dados obtidos são compatíveis com os dados de Santos e Hamdan (2007), demonstrando não haver variação significativa na concentração inibitória mínima dos antifúngicos testados contra *T. rubrum* após passagem por *A. castellanii*. Os dados encontrados por Tamura *et al.* (2014), desafiando *T. rubrum* (n= 14) com estes mesmos antifúngicos, mostram que, para Terbinafina, a CIM encontrada foi de 0,004 – 0,06 µg/mL, valores duas ou até mesmo quatro vezes menores que os encontrados neste estudo, variando de acordo com a condição do fungo, apresentando também valores até 4 vezes superiores. Para o antifúngico Cetoconazol, a CIM variou de 0,06 – 0,5 µg/mL; onde neste estudo encontrou-se apenas 0,5 µg/mL. Para Itraconazol, os autores encontraram uma variação na CIM de 0,015 – 0,25 µg/mL, valores estes semelhantes aos encontrados no alcance deste estudo. Devido a capacidade da ameba de produzir enzimas como fator de virulência, tais como

superóxido dismutase, proteases, elastase, fosfolipases (LORENZO-MORALES, KHAN & WALOCHNIK, 2015), tais enzimas podem afetar o fungo, que está deixando-o mais suscetível ao antifúngico.

7 Sumário de resultados

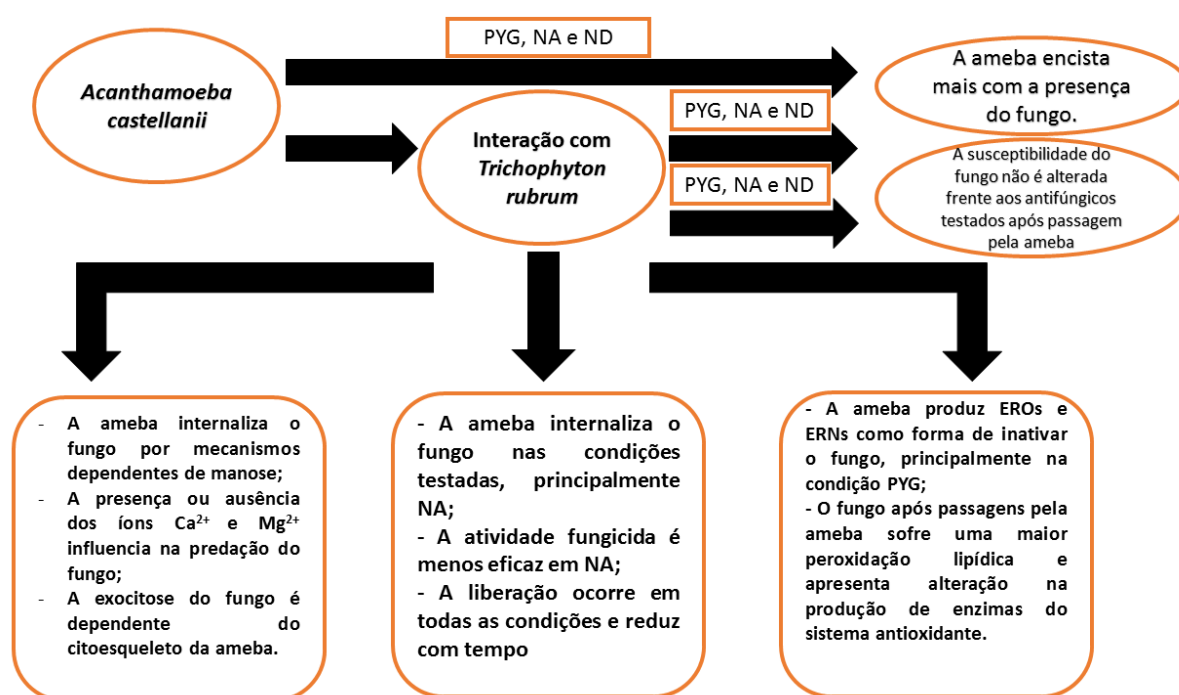


Figura 21 – Sumário de resultados – síntese de todos os resultados obtidos durante este trabalho.

8 Conclusões

Os resultados demonstram que a ameba internaliza o fungo, independente da condição nutricional e esta internalização decresce com o tempo, sendo que esta predação pode ser aumentada pela presença dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} . Por outro lado, a ameba internaliza *T. rubrum* por mecanismo dependente de manose em trofozóitos e não em cistos e *A. castellanii* produz ROS e PRN que influenciam a sua atividade fungicida, que é independente de manose. A ameba libera esse fungo de seu interior por um mecanismo dependente de

actina, e o fungo, por sua vez produz enzimas do complexo antioxidante para sobreviver no interior da ameba.

Referências

ACHTERMAN, R. R. *et al.* Sequenced dermatophyte strains: growth rate, conidiation, drug susceptibilities, and virulence in an invertebrate model. **Fungal Genet Biol.** v. 48. p. 335–41. 2011.

AFSHARI, M. L. *et al.* Antifungal susceptibility and virulence factors of clinically isolated dermatophytes in Tehran, Iran. **Iranian Journal of Microbiology.** v. 8, n. 1, p. 36-46. 2016.

AGHAMIRIAN, M.R., GHIASIAN SA. Dermatophytes as a cause of epizoonoses in dairy cattle and humans in Iran: epidemiological and clinical aspects. **Mycoses.** v.54. p. E52 - 6. 2011.

ALLEN, P.G.; DAWIDOWICZ, E.A. Phagocytosis in *Acanthamoeba*: 1. A mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. **J Cell Physiol** 145: 508–513. 1990

ALFIERI, S. C. *et al.* Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 2, p. 220–227, abr. 2000

ALVARENGA L. S., FREITAS D., LIMA A. L. H. Ceratite por *Acanthamoeba*. **Arq.Bras. Oftalmol.** 63: 2, 2000.

ALY, R. Ecology and epidemiology of dermatophyte infections. **Journal of the American academy of dermathology.** 1994.

ALY, R. Ecology, epidemiology and diagnosis of tinea capitis. **Pediatr Infect Dis J.** v. 18. p.180-5. 1999.

ANDERSON, J.H. In vitro survival of human pathogenic fungi in Hawaiian beach sand. **Sabouraudia.** v. 17. p. 13-22. 1979.

ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; WARNOCK, D. W.; MORRISON, C. J. Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between in vitro antifungal susceptibility test results and in vivo outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 44, n. 8. P. 2081-2085. 2000.

ARANTE, F. C. et al. Micoses, dermatoses e dermatofitose. **Acta. Scientiae Veterinarie.** São Paulo/SP, v. 22, n. 13, p. 13-17, 2003.

BALTAZAR, L. N. et al. IFN- γ impairs *Trichophyton rubrum* proliferation in a murine model of dermatophytosis through the production of IL-1 β and reactive oxygen species. **Medical Mycology.** v.52, 293-302. 2014.

BALTAZAR, L. N.; SANTOS, D. A. Perspectives on animal models of dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*. **Virulence.** v. 6. p. 372 – 375. 2016.

BIDOCHKA, M. J., CLARK, D. C., LEWIS, M. W., AND KEYHANI, N. O. Could insect phagocytic avoidance by entomogenous fungi have evolved via selection against soil amoeboid predators? **Microbiology** 156, 2164–2171. 2010

BORATTO, P.; ALBARNAZ. J.D.; ALMEIDA, G.M.; BOTELHO, L.; FONTES, A.C.; COSTA, A.O.; SANTOS, D.D.E.A.; BONJARDIM, C.A.; LA SCOLA, B.; KROON, E.G.; ABRAHÃO, J.S. *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus prevents amoebal encystment-mediating serine proteinase expression and circumvents cell encystment. **J Virol.** 2015 Mar; 89 (5):2962-5.

BOWERS, B.; KORN, E.D. Localization of lipophosphoglycan on both sides of *Acanthamoeba* plasma membrane. **J Cell Biol**, v. 62, p. 533–540. 1974.

BRAKHAGE, A. A. *et al.* Interaction of phagocytes with filamentous fungi. **Curr. Opin. Microbiol.** v.,13 409-415. 2010.

BROOKS, K.E.; BENDER, J.F. Tinea pedis: diagnosis and treatment. **Clin Podiatr Med Surg.** v. 13. p.31–46. 1996.

BURKHART, C. G. Tinea incognito. **Arch Dermatol.** v. 117. p. 606–7. 1981

BURKHART, C. G.; CHANG, H.; GOTTWALD, L. Tinea corporis in human immunodeficiency virus-positive patients: case report and assessment of oral therapy. **Pharmacology and therapeutics.** v. 42. p. 839-843. 2003.

BYUN T, KOFOD L, BLINKOVSKY A. Synergistic action of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase and a non-specific aminopeptidase in protein hydrolysis. **J Agric Food Chem.** 49: 2061–2063. 2001.

CAMPOS, M.R.M. *et al.* Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. **Microbes and Infection.** v.8, p. 372-379. 2006.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **J. Infect. Dis.** 184 (3), 337–344. 2001.

CASADEVALL, A. Cards of virulence and the global virulome for humans. **Microbe** 1 (8), 359–364. 2006

CHAN, M. M. Y. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of skin. **Biochemical Pharmacology.** v.63. p. 99-104. 2002.

CHINNAPUN, D. Virulence factors involved in pathogenicity of dermatophytes. **Walalaik J. Sci. & Tech**, v. 12, p. 573-580. 2015.

CHRISMAN, C. J., ALVAREZ, M., AND CASADEVALL, A. Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by, and nonlytic exocytosis from *Acanthamoeba castellanii*. **Appl. Environ. Microbiol.** 76, 6056–6062. 2010.

CHRISMAN, C. J. *et al.* Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. **PLoSPathog.** 7 (5), e1002047. 2011.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M38–A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

COSTA, M.C.; SANTOS, J.R.; RIBEIRO, M.J.; FREITAS, G.J.; BASTOS, R.W.; FERREIRA, G.F.; MIRANDA, A.S.; ARIFA, R.D.; SANTOS, P.C.; MARTINS, F. dos S; PAIXÃO, T.A.; TEIXEIRA, A.L.; SOUZA, D.G.; SANTOS, D.A. The absence of microbiota delays the inflammatory response to *Cryptococcus gattii*. **Int J Med Microbiol.** 2016 Jun; 306(4):187-95.

COHEN, A. D. *et al.* Prevalence and risk factors for tinea pedis in Israeli soldiers. **Int J Dermatol.** v.44. p. 1002-5. 2005.

DAVIES, B.; CHATTINGS, L.S.; EDWARDS, S. W. Superoxide generation during phagocytosis by *Acanthamoeba castellanii*: similarities to the respiratory burst of immune phagocytes. **Journal of General Microbiology.** v.137, 705-710. 1991.

DETANDT, M.; NOLARD, N. Fungal contamination of the floors of swimming pools, particularly subtropical swimming paradises. **Mycoses**. v.38. p.509-13. 1995.

DUARTE J. L. *et al.* Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. **Exp Parasitol**. v. 135, p. 9–14. 2013.

ELAVARASHI, E.; KINDO, A. J.; RANGARAJAN, S. Enzymatic and non-enzymatic virulence activities of dermatophytes on solid media. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 11. p. DC23-DC25. 2017.

ELEWSKI, B.; CHARIF, M.A. Prevalence of onychomycosis in patients attending a dermatology clinic in northeastern Ohio for other conditions. **Arch Dermatol**. 133:1172-1173.1997.

ELEWSKI, B.E. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. **Clin Microb Ver**. 11(3):415–29. 1998.

FERREIRA, G.F.; SANTOS, J. R. A.; COSTA, M. C.; HOLANDA, R. A.; DENADAI, A. M. L.; FREITAS, G. J. C.; SANTOS, A. R. C.; TAVARES, P. B.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, D. A. Heteroresistance to Itraconazole Alters the Morphology and Increases the Virulence of *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, n. 8, v. 59, p. 4600 – 4609, Ago. 2015.

FU, M. S.; CASADEVALL, A. Divalent metal cations potentiate the predatory capacity of amoeba for *Cryptococcus neoformans*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 84. 2018.

FISCHER, E. How long do dermatophytes survive in the water of indoor pools? **Dermatologica**. v. 165. p. 352-4. 1982.

GARCÍA-MADRID, L. A. *et al.* *Trichophyton rubrum* manipulates the innate immune functions of human keratinocytes. **Central European Journal of Biology**. v.6, 902-909. 2011.

GASPARTO, A. K. *et al.* 2-(Benzylideneamino)phenol: A promising hydroxyaldimine with potent activity against dermatophytoses. **Mycopathologia**. 2014.

GRÄSER, Y. *et al.* Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. **Med Mycol** v. 37, n.5, p. 315–330.1999.

GRÄSER, Y., KUIJPERS, A.F., PRESBER, W., DE HOOG, G.S., Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. **J. Clin. Microbiol.** 38, 3329–3336. 2000.

GRÄSER, Y. *et al.* New insights in dermatophyte research. **Medical mycology**. v. 56, S2-S9. 2018.

GUIMARÃES, A. J. *et al.* *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganism: one bridge from environment to host virulence. **Microbiological Research**. v. 193, p. 30 – 38. 2016.

GUPTA, A.K. *et al.* Detection of xanthomegnin in epidermal materials infected with *Trichophyton rubrum*. **J. Invest. Dermatol.** v.115, p. 901-5. 2000.

GUPTA, A. K. *et al.* Dermatophytoses: the management of fungal infections. **SKINmed: dermatology for the clinician**. 2005.

HAINER, B. L. Dermatophyte infections. **American Family Physician**. v. 67, n. 1, p. 101- 108. 2003.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. **Microbiologia ilustrada**. São Paulo: Artmed; 2008.

HAYETTE, M.P.; SACHELI, R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. **Curr. Fungal Infect. Rep.** p. 1-16. 2015.

HILMARSDOTTIR, I. *et al.* Dermatophytes in a swimming pool facility: difference in dermatophyte load in men's and women's dressing rooms. **Acta Derm-Venereol.** v.85. p. 267-e8. 2005.

HOBSON, R. P. The effects of diffusates from the spores of *Aspergillus fumigatus* and *A. terreus* on human neutrophils, *Naegleria gruberi* and *Acanthamoeba castellanii*. **Med. Mycol.** 38, 133–141. 2000.

ILKIT, M.; DURDU, M. Tinea pedis: the etiology and global epidemiology of a common fungal infection. **Critical Reviews in Microbiology.** v. 41. n. 3, p. 374 – 388. 2015.

JILLSON, O. F.; NICKERSON, W. J. Mutual antagonism between pathogenic fungi. Inhibition of dimorphism in *Candida albicans*. **Mycologia.** v. 40. p. 369-385. 1948.

JOHNSON RA. An update on dermatophytosis: dermatophyte infections in human immune deficiency virus (HIV) disease. **J Am Acad Dermatol.** v. 43. p. S135–S142. 2000.

JOUSSON, A. O.; LE'CHENNEA, B.; BONTEMSA, O.; MIGNONB, B.; REICHARDC, U.; BARBLAND, J.; QUADRONID, M.; MONOD, M. Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. **Gene**, 339:79-88. 2004.

JUNGERMAN, P. F.; SCHWARTZMAN, R. M. **Veterinary Medical Micology.** Philadelphia: Lea & Febiger, 1972. Cap.1, P.3-28.

KAUFMAN, G. *et al.* Infection stages of the dermatophytes pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. **Medical Mycology.** v. 45, 149-155. 2007.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 30, p. 564 – 595. 2006.

KERN, M.E, BLEVINS, K.S. **Micologia Médica**: texto e atlas. 2.ed. São Paulo: Editorial Premier, 1999.

KHUNKITTI, W.; LLOYD, D.; FURR, J. R.; RUSSELL, A.D. *Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. **Journal of Infection**, v. 36, p. 43-48, 1998.

KUNERT J. Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporum gypseum*. **Mycoses.**;35:343–8. 1992

LAKSHMIPATY, D. T.; KANNABIRAN, K. Review in dermatomycosis: pathogenesis and treatment. **Natural Science.** v. 2, p. 726 – 731. 2010.

LAM, J. *et al.* Baseline mechanical characterization of J774 macrophages. **Biophysical Journal.** v.96. p. 248-254. 2009.

LEE, Y.R.; NA, B.K.; MOON, E.K.; SONG, S.M.; JOO, S.Y.; KONG, H.H.; GOO, Y.K.; CHUNG, D.I.; HONG, Y. Essential Role for an M17 Leucine Aminopeptidase in Encystation of *Acanthamoeba castellanii*. **PLoS ONE** v.10 n.6 p.1-18, 2015.

LÉCHENNE, B. *et al.* Sulphite efflux pumps in *Aspergillus fumigatus* and dermatophytes. **Microbiology**; 153, 905-13. 2007.

LEYDEN, J. J. Progression of interdigital infections from simplex to complex. **Journal of the American academy of dermatology.** v. 28, n. 5. p. s7-s11. 1993.

LIU, T. et al. Analysis of gene expression changes in *Trichophyton rubrum* after skin interaction. **J. Med. Microbiol.**, v. 63, p. 642-8. 2014

LLOYD, D. Encystment in *Acanthamoeba castellanii*: a review. **Experimental Parasitology**. 2014.

LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N.A.; WALOCHNIK, J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**. v. 22, p. 1-20. 2015.

MANCIANTI, F.; NARDONI, S.; CECCHI, S.; CORAZZA, M.; TACCINI, F. Dermatophytes isolated from symptomatic dogs and cats in Tuscany, Italy during a 15-year period. **Mycopathologia** 156, 13-18. 2003.

MARCIANO CABRAL, F., CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. **Clin. Microbiol Rev.** 16: 273 – 307, 2003.

MAZUR, T.; HADAS, E.; IWANICKA, I. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. **Trop Med Parasitol** 46: 106–108. 1995

MEDEIROS, F.; CREPALDI, N.; TOGNOLI, L. Dermatofitos – Revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. n.12. 2009.

MENDEZ-TOVAR, L. J. Pathogenesis of dermatophytosis and tinea versicolor. **Clin. Dermatol**. v.28, p. 185-9. 2010.

MONOD, M. *et al.* Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Microbiology**; v.151, 145-55. 2005.

MORIELLO, K. A. *et al.* Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats. **Vet. Dermatol**. v. 28, p. 266 – e68. 2017.

NAGINGTON, J., WATSON, P. G., PLAYFAIR, T. J., MCGILL, J., JONES, B.R., STEELE, A.D. Amoebic infection of the eye. **Lancet**. 1537 – 1540, 1974.

NEFF, R. J. *et al.* Induction of synchronous encystment differentiation in *Acanthamoeba* sp. In: Prescott, D.M. editor. **Methods in cell physiology**. New York: Academic Press. v.1, p. 55-83. 1964.

NENOFF, P.; HERRMANN, J.; GRÄSER, Y. *Trichophyton mentragriphytes sive interdigitale?* A dermatophyte in course of time. **JDDG**. v. 3. p. 198 – 2002. 2007.

NENOFF, P., ERHARD, M., SIMON, J.C., MUYLOWA, G.K., HERRMANN, J., RATAJ, W., GRASER, Y.. MALDI-TOF mass spectrometry – a rapid method for the identification of dermatophyte species. **Med. Mycol.** 51, 17–24. 2013.

NESTLE F.O., DI MEGLIO P., QIN J., NICKOLOFF B., Skin Immune sentinels in health and disease, **Nat. Rev. Immunol.**, 9, 679-691. 2009.

NOSÉ, W. *et al.* Ulcera de córnea por *Acanthamoeba*: quatro primeiros casos do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 51, n. 6, p. 223–226, 1988.

NUNES, T. E. T *et al.* *Acanthamoeba* and *Fusarium* interactions: a possible problem in keratitis. **Acta Tropica** 2016.

OUTERBRIDGE, C. A. Mycologic disorders of the skin. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 21, p. 128-134, 2006.

PAGE, F.C. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. **J. Protozool.** 14: 709 – 724, 1967.

PERDOMO, O.J.J. *et al.* Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental Shigellosis. **J. Exp. Med.** v.180. 1994

PEREIRA, E. *et al.* Microbiological and mycological beach sand quality in a volcanic environment: Madeira archipelago, Portugal. **Sci Total Environ.** p. 469-79. 2013.

PEREIRA, F. O. *et al.* Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology.** v. 51. p. 507-513. 2013.

PERES, N. T. A. *et al.* Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **An. Bras. Dermatol.** v.85, n.5. 2010.

PHILIPPE, B. *et al.* Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. **Infect. Immun.** v.71, 3034-3042. 2003.

PIRES, C. A. A. *et al.* Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **An. Bras. Dermatol.** v. 89, p. 259 – 264. 2014.

REZAEI-MATEHKOLAEI, A. *et al.* In vitro antifungal activity of novel triazole efinaconazole and five comparators against dermatophytes isolates. **Antimicrobial Agentes and Chemotherapy.** 2018.

RIBEIRO, N. Q.; COSTA, M. C.; MAGALHÃES, T. F. F.; CARNEIRO, H. C. S.; OLIVEIRA, L. V.; FONTES, A. C. L.; SANTOS, J. R. A.; FERREIRA, G. F.; ARAUJO, G. R. S.; ALVES, V.; FRASES, S.; PAIXÃO, T. A.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; SANTOS, D. A. Atorvastatin as a promising anticryptococcal agent. **International Journal of Antimicrobial Agents.** v. 49. p. 695–702. 2017.

RODRIGUES, R. A. L. *et al.* Mimivirus fibrils are important for viral attachment to the microbial world by a diverse glycoside interaction repertoire. **J. Virol.** v. 89, p. 11812 – 11819. 2015.

ROSEN, T. Dermatophytosis: diagnostic pointers and therapeutic pitfalls. **Consultant**. v. 37. p. 1545-57. 1997

SABINO, R. *et al.* Routine screening of harmful microorganisms in beach sands: implications to public health. **Sci Total Environ**. v. 472. p. 1062 - e9. 2014.

SADRI, M. F. *et al.* The frequency of tinea pedis in patients with Tinea cruris in Tehran, Iran. **Mycoses**. v. 43. p. 41-44. 2000.

SANTIAGO, K. *et al.* Monocyte-derived dendritic cells from patients with dermatophytosis restrict the growth of *Trichophyton rubrum* and induce CD4-T cell activation. **PLOS ONE**. v.9. 2014.

SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. **Jour Clin Microbiology**, Apr. 2005, p. 1917–1920. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17118937>>. Acesso em: 16 fev. 2018.

SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. *In vitro* activities of four antifungal drugs against *Trichophyton rubrum* isolates exhibiting resistance to fluconazole. **Mycoses**. v. 50. p. 286-289. 2007.

SANTOS, J. R.; HOLANDA, R. A.; FRASES, S.; BRAVIM, M.; ARAUJO, G. S.; SANTOS, P. C. *et al.* Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine Cryptococcosis. **PLoS ONE**, 2014.

SCHUSTER, F. L., VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for parasitology**. 34: 1001 – 1027, 2004.

SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**. v. 166. p. 335-52. 2008.

SEGAL, E.; FRENKEL, M. Dermatophyte infections in environmental contexts. **Research in Microbiology**. v. 166, p. 564 – 569. 2015.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasites & Vectors**. v. 5, p. 1- 13. 2012.

SIQUEIRA, E.R. *et al.* Occurrence of dermatophyte, in nails, feet and hands of university students. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 39:269-271. 2006.

SOARES, B. M.; ALVES, O. A.; FERREIRA, M. V.; AMORIM, J. C.; SOUSA, G. R.; SILVEIRA, L. B.; PRATES, R. A; AVILA, T. V.; BALTAZAR, L. M.; DE SOUZA, D. D. A. G.; SANTOS, D. A.; MODOLO, L. V.; CISALPINO, P. S.; PINOTTI, M. *Cryptococcus gattii*: in vitro susceptibility to photodynamic inactivation. **Photochem Photobiol**, v. 87, n. 2, p. 357-64, Mar-Apr, 2011.

SPIEWAK, R.; SZOSTAK, W. Zoophilic and geophilic dermatophytoses among farmers and non-farmers in eastern Poland. **Ann Agr Env Med**. v. 7. p.125-9. 2000.

SRIRANGANADANE, D. *et al.* Identification of novel secreted proteases during extracellular proteolysis by dermatophytes at acidic pH. **Proteomics**, 11:4422–4433. 2011.

STAIB, P. *et al.*, Differential gene expression in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae* in vitro versus during infection. **Microbiology**, vol. 156, no. 3, pp. 884–895, 2010.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoeba suggest an explanation for its virulence

and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **PNAS**. v. 98, p. 15245 – 15250. 2001

STEENBERGEN, J.N., et al. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. **Infect.Immun.** 72 (6), 3478–3488. 2004.

SURJUSHE A. et al. A clinical and mycological study of onychomycosis in HIV infection. **Indian J Dermatol Venereol Leprol.** v. 73. n. 6, p. 397-401. 2007.

SWANSON, J. A. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 9:639–649. 2008.

TAMURA, T. et al. In vitro susceptibility of dermatomycoses agents to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index combined effects of amoralfine and itraconazole in dermatophytes. **Microbiology and Immunology.** v. 58, p. 1-8. 2014.

TAN, Y. et al. Dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* mimicking syphilid: a case report and review of literature. **Mycoses.** v. 57. p. 312-315. 2014.

TRABELSI, H. et al. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. **Pathologie Biologie.** v. 60, p. 399 – 405. 2012.

TSAI, Y. J. et al. The dog mite, *Demodex canis*: prevalence, fungal co-infection, reactions to light, and hair follicle apoptosis. **Journal of Insect Science.** v. 11. P. 1-13. 2011.

VAN DER HENST, C. et al. An intracellular replication niche for *Vibrio cholerae* in the amoeba *Acanthamoeba castellanii*. **The ISME Journal.** v.10, p. 897-910. 2016.

VAN WAEYENBERGHE, L. *et al.* Germination of *Aspergillus fumigatus* inside avian respiratory macrophages is associated with cytotoxicity. **Veterinary Research**. v.43. p.1-5. 2012.

VAN WAEYENBERGHE, L. *et al.* Interaction of *Aspergillus fumigatus* conidia with *Acanthamoeba castellanii* parallels macrophage-fungus interactions. **Environ Microbiol Rep**. 5, 819–824. 2013

VERMOUT, S. *et al.* Pathogenesis of dermatophytosis. **Mycopathologia**. v. 166, p. 267-75. 2008

VISVESVARA, G. S., MOURA, H., SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunol Med Microbiol**. 50: 1 – 26, 2007.

WAGNER, D. K.; SOHNLE, P.G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. **Clin. Microbiol. Rev**. v.8, p. 317-335,1995.

WAWARZKIEWICZ, K.; WOLSKI, T.; LABARZEWSKI, J. Screening the keratinolytic activity of dermatophyte in vitro. **Mycopathologia**. v.114, p.1-8. 1991.

WEISMAN, R.A. Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. **Annu Rev Microbiol** 30: 189–219. 1976.

WESTERBERG, D.; VOYACK, M. J. Onychomycosis: current trends in diagnosis and treatment. **American Family Phisician**. v. 88. n. 11, p. 762 – 770C. 2013.

WHITE, T. C. *et al.* Fungi on the skin: dermatophytes and *Malassezia*. **Cold Spring Hard. Perspect. Med**. v. 4, p 1- 16. 2014.

YOO, K.T.; JUNG, S.Y. Effects of mannose on pathogenesis of *Acanthamoeba castellanii*. **Korean J Parasitol.** n.4, 365-369. 2012.

YOSHIKAWA, F.S.; FERREIRA, L.G.; ALMEIDA, S.R. IL-1 signaling inhibits *Trichophyton rubrum* conidia development and modulates the IL-17 response *in vivo*. **Virulence.** v.6, 449-457. 2015.

YOSHIKAWA, F. S. *et al.* An *in vitro* model for study of the macrophage response upon *Trichophyton rubrum* challenge. **Mycopathologia.** 2016.

YOUNGCHIM, S. *et al.* Melanogenesis in dermatophyte species *in vitro* and during infection. **Microbiology.** v. 157, p. 2348-56. 2011.

YUKI, T. *et al.* Activation of TLR2 enhances tight junction barrier in epidermal keratinocytes. **J Immunol.**;187:3230- 7. 2011

ZAITS, C. Imunologia das dermatofitoses. **An. Bras. Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 69 (3), p. 217-222, 1994.

ZHAN, P.; LIU, W. The changing face of dermatophytic infections worldwide. **Mycopathologia.** 2016

ZUBER, T.J.; BADDAM, K. Superficial fungal infection of the skin. Where and how it appears help determine therapy. **Postgrad Med.** v. 109. p.117-132. 2001.

Atividades desenvolvidas



Certificamos que **Lucas Vieira de Faria** participou da COMISSÃO ORGANIZADORA do “**III Simpósio de Microbiologia da UFMG – Doenças Microbianas Emergentes**”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 05 e 06 de setembro de 2016, com carga horária de 16h


Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza
Coordenadora III Simpósio de Microbiologia da UFMG


Prof. Dr. Paulo César Peregrino Ferreira
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia





III SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG
DOENÇAS MICROBIANAS EMERGENTES

CERTIFICADO

Certificamos que **Lucas Vieira de Faria** participou do “III Simpósio de Microbiologia da UFMG – Doenças Microbianas Emergentes”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 05 e 06 de setembro de 2016, com carga horária de 16h.


 Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza
 Coordenadora II Simpósio de Microbiologia da UFMG


 Prof. Dr. Paulo César Peregrino Ferreira
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia



III SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG
DOENÇAS MICROBIANAS EMERGENTES

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **Staphylococcus COAGULASE-NEGATIVO ISOLADOS DE PACIENTES COM INFECÇÃO DE CORRENTE SANGUÍNEA APRESENTAM DIFERENTES PERFIS DE VIRULÊNCIA EM MODELO IN VIVO DE Caenorhabditis elegans** foi apresentado na qualidade PÔSTER, tendo como autores **Pedroso, S.H.S.P.; Bastos, R.W.; Viana, R.O.; Faria L.V.; Gouveia, V.A.; Serufo, J.C.; Farias, L.M.; Carvalho, M.A.R.; Bomfim, M.R.Q.; Santos, S.G.** no “III Simpósio de Microbiologia da UFMG – Doenças Microbianas Emergentes”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 05 e 06 de setembro de 2016, com carga horária de 16h.


 Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza
 Coordenadora III Simpósio de Microbiologia da UFMG


 Prof. Dr. Paulo César Peregrino Ferreira
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia





IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG
Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia

CERTIFICADO

Certificamos que **Lucas Vieira de Faria** participou da COMISSÃO ORGANIZADORA do “IV Simpósio de Microbiologia da UFMG – Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 02 e 03 de outubro de 2017, com carga horária de 16h.



Simone Gonçalves dos Santos
 Profa. Dra. Simone Gonçalves dos Santos
 Coordenadora IV Simpósio de Microbiologia da UFMG

Flávio Guimarães da Fonseca
 Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia



IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG
Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE Acanthamoeba castellanii EM AGENTES DE DERMATOFITOSE** foi apresentado na qualidade PÔSTER, tendo como autores **Faria, L. V.; Carmo, P. H. F.; Costa, M. C.; Baltazar, L. M.; Santos, D. A.** no “IV Simpósio de Microbiologia da UFMG – Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 02 e 03 outubro de 2017, com carga horária de 16h.



Simone Gonçalves dos Santos
 Profa. Dra. Simone Gonçalves dos Santos
 Coordenadora IV Simpósio de Microbiologia da UFMG

Flávio Guimarães da Fonseca
 Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia





29° Congresso Brasileiro de Microbiologia

De 22 a 25 de Outubro de 2017 / Foz do Iguaçu-Paraná-Brasil
"60 anos da Sociedade Brasileira de Microbiologia"

Certificado

Certificamos que LUCAS VIEIRA DE FARIA participou do 29° Congresso Brasileiro de Microbiologia realizado no Rafain Palace Hotel e Convention Center, na cidade de Foz do Iguaçu, PR, no período de 22 a 25 de outubro de 2017.



Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda
Presidente da SBM



Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio
1° Secretário da SBM

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:















29° Congresso Brasileiro de Microbiologia

De 22 a 25 de Outubro de 2017 / Foz do Iguaçu-Paraná-Brasil
"60 anos da Sociedade Brasileira de Microbiologia"

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado 5-FLUOROURACIL (5-FU) AS A POTENTIAL SUBSTITUTE FOR FLUORODEOXYURIDINE (FUDR) IN CAENORHABDITIS ELEGANS CULTURE. com a autoria de: FARIA, L.V., ALVES, V.S. foi apresentado na forma de pôster durante o 29° CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA - CBM realizado no Rafain Palace Hotel e Convention Center, na cidade de Foz do Iguaçu, PR, no período de 22 a 25 de outubro de 2017.



Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda
Presidente da SBM



Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio
1° Secretário da SBM

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:















V SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG

PROFESSOR EDUARDO OSÓRIO CISALPINO:

Desafios Atuais no Enfrentamento de Doenças Microbianas

CERTIFICADO

Certificamos que Lucas Vieira de Faria participou da COMISSÃO ORGANIZADORA no “V Simpósio de Microbiologia da UFMG – Professor Eduardo Osório Cisalpino: Desafios Atuais no Enfrentamento de Doenças Microbianas”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 05 e 06 de setembro de 2018.



Prof.ª. Dra. Simone Gonçalves dos Santos

Coordenadora do V Simpósio de Microbiologia da UFMG



Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia



V SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG

PROFESSOR EDUARDO OSÓRIO CISALPINO:

Desafios Atuais no Enfrentamento de Doenças Microbianas

CERTIFICADO

Certificamos que Faria, L. V.; Carmo, P. H. F.; Costa, M. C.; Baltazar, L. M.; Santos, D. A. teve o seu trabalho “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA E ANTIFÚNGICA DE *Acanthamoeba castellanii* QUANDO DESAFIADA PELO FUNGO *Trichophyton rubrum*.” APRESENTADO NA CATEGORIA *POSTER* no “V Simpósio de Microbiologia da UFMG – Professor Eduardo Osório Cisalpino: Desafios Atuais no Enfrentamento de Doenças Microbianas”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 05 e 06 de setembro de 2018.



Prof.ª. Dra. Simone Gonçalves dos Santos

Coordenadora do V Simpósio de Microbiologia da UFMG



Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

