

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

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO A ANTIFÚNGICOS CLÍNICOS NA  
SUSCEPTIBILIDADE, FISILOGIA, VIRULÊNCIA E ESTRESSE OXIDATIVO E  
NITROSATIVO EM AGENTES CAUSADORES DE DERMATOFITOSE**

**PAULO HENRIQUE FONSECA DO CARMO**

**Belo Horizonte – MG**

**2021**

**PAULO HENRIQUE FONSECA DO CARMO**

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO A ANTIFÚNGICOS CLÍNICOS NA  
SUSCEPTIBILIDADE, FISIOLOGIA, VIRULÊNCIA E ESTRESSE OXIDATIVO E  
NITROSATIVO EM AGENTES CAUSADORES DE DERMATOFITOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

**Orientador:**

Prof. Dr. Daniel Assis Santos

**Coorientadora:**

Profa. Dra. Nalu Teixeira Aguiar Peres

**Belo Horizonte – MG**

**2021**

043 Carmo, Paulo Henrique Fonseca do.

Influência da exposição a antifúngicos clínicos na susceptibilidade, fisiologia, virulência e estresse oxidativo e nitrosativo em agentes causadores de dermatofitose [manuscrito] / Paulo Henrique Fonseca do Carmo. – 2021.  
163 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Assis Santos. Coorientadora: Profa. Dra. Nalu Teixeira Aguiar Peres.

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

1. Microbiologia. 2. Arthrodermataceae. 3. Antifúngicos. 4. Estresse Oxidativo. 5. Farmacorresistência Fúngica. I. Santos, Daniel Assis. II. Peres, Nalu Teixeira Aguiar. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



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

#### ATA DE DEFESA DE TESE

#### ATA DA DEFESA DE TESE DE PAULO HENRIQUE FONSECA DO CARMO

Nº REGISTRO: 2017773209

Às 14:00 horas do dia 25 de outubro de 2021, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Estefânia Mara do Nascimento Martins (CDTN – UFMG), Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante (UFC), Gabriella de Freitas Ferreira (UFJF), Tamires Aparecida Bitencourt (FMRP – USP) e o Prof. Dr. Daniel de Assis Santos – Orientador, para julgar o trabalho final "Influência da exposição a antifúngicos clínicos na susceptibilidade, fisiologia, virulência e estresse oxidativo e nitrosativo em agentes causadores de dermatofitose", do aluno Paulo Henrique Fonseca do Carmo, requisito final para a obtenção do Grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Daniel de Assis Santos, 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. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma. Belo Horizonte, 25 de outubro de 2021.

#### Membros da Banca:

Dra. Estefânia Mara do Nascimento Martins

Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante

Dra. Gabriella de Freitas Ferreira

Dra. Tamires Aparecida Bitencourt

#### De acordo:

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

(Orientador)

Profa. Daniele da Glória de Souza  
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação  
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por Daniel de Assis Santos, Professor do Magistério Superior, em 26/10/2021, às 08:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 26/10/2021, às 09:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, Usuário Externo, em 26/10/2021, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Gabriella Freitas Ferreira, Usuário Externo, em 26/10/2021, às 18:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Tamires Aparecida Bitencourt, Usuário Externo, em 09/11/2021, às 09:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Estefânia Mara do Nascimento Martins, Usuário Externo, em 10/11/2021, às 09:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 1003071 e o código CRC 892DDF95.

## **Dedico**

À Deus, que me deu discernimento, sabedoria e coragem para lidar e vencer os desafios.

Aos meus pais, Paulo e Glória, meu exemplo de amor, perseverança, cuidado e dedicação.

A minha irmã, Paula, pelo carinho e amor fraternal.

Ao Maurício, pelo amor incondicional e compreensão em todos os momentos dessa caminhada.

Aos meus amigos, pelos momentos reconfortantes e alegres.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Daniel Santos, meu orientador, por ter confiado em meu trabalho, pela disponibilidade em ajudar e, sobretudo, por ter me auxiliado a realizar um sonho.

À Profa. Nalu Peres, minha coorientadora, pela ótima convivência, pelo cuidado, atenção e gentileza e por ter me ensinado tanto.

À Profa. Maria Aparecida Resende-Stoianoff, por me receber em seu laboratório e ter sido extremamente generosa comigo. Obrigado por todos os ensinamentos e pelo carinho.

Ao CNPq, pela bolsa de estudo e a CAPES e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

Ao PPGM da UFMG. Obrigado por me propiciar um ambiente de aprendizagem de nível intelectual tão alto, mas, o mais importante, por viabilizar relações tão ricas com professores e colegas. À Débora e Tiago, obrigado pela ajuda, atenção e cuidado conosco.

Aos amigos e colegas da Micologia, Marliete Carvalho, Bárbara Miranda, Victor Leocádio, Hellem Carneiro, Lorena Oliveira, Rafael Bastos, Gustavo Freitas, Elúzia Peres, Ludmila Gouveia, Lucas Vieira, João Dornelas, Renata Conceição, Anderson Nonato, Noelly Queiroz, Bruna Almeida, Lívia Vitorino, Júlio Santos, Geislane Quaresma, Douglas Boniek e Daniele Silva, muito obrigado pela parceria, pelo auxílio nos experimentos e pelo companheirismo. Vocês são os melhores!

Ao “MicroBeer”, muito obrigado. Vocês fizeram esses anos mais leves e mais divertidos. Ter a companhia de vocês foi fundamental para que tudo finalizasse bem.

Ao “O melhor da Micro”, meus amigos Patrícia Campos e Lucas Vieira, pelo amor, amizade, paciência e carinho. Muito obrigado pelas risadas e pela companhia.

À nossa querida técnica Rosângela Ananias. Muito obrigado pelas conversas, pelo auxílio e pela companhia sempre agradável.

Aos meus pais, que sempre me mostraram a importância do estudo e me incentivaram ao longo de toda a minha vida, tendo que, por vezes, abrir mão dos seus próprios projetos. Amo vocês!

Aos meus familiares, avós, avôs, tias, tios, primas, primos e irmã, que souberam compreender minha ausência em alguns momentos.

Ao Maurício Moreira, obrigado pelo companheirismo e pela parceria. Sem você, a caminhada teria sido muito mais difícil. Muito obrigado! Te amo!

Por fim, agradeço a todos que contribuíram e participaram, de forma direta ou indireta, na realização deste trabalho.



## RESUMO

A emergência da resistência aos antifúngicos e a falha terapêutica advinda desse processo é um fato cada vez mais recorrente na prática clínica. A resistência pode ser definida como uma redução da eficácia de um fármaco frente a toda uma população de células fúngicas. Para dermatófitos, os mecanismos de resistência ainda não são totalmente elucidados. Além disso, a menor incidência de resistência frente a determinados antifúngicos sugere a ocorrência de mecanismos de ação paralelos àqueles descritos. Assim, essa pesquisa avaliou a influência da exposição de dermatófitos aos antifúngicos terbinafina e itraconazol na susceptibilidade a drogas, na virulência e interação fungo-hospedeiro *in vitro* e *in vivo*, e analisou o papel do estresse oxidativo e nitrosativo no tratamento *in vitro* com amorolfina e ciclopirox olamina. No primeiro capítulo, dezesseis linhagens selvagens de dermatófitos passaram por um processo de adaptação em meio suplementado com itraconazol ou terbinafina e, posteriormente, foram cultivadas em meio na ausência destes antifúngicos. Onze linhagens (70,58%) apresentaram menor susceptibilidade ao itraconazol e cinco (29,41%) à terbinafina. Além disso, estas linhagens exibiram menor susceptibilidade também a outros antifúngicos clínicos como amorolfina, cetoconazol e ciclopirox olamina. A exposição a itraconazol acarretou aumento da expressão do gene *ERG11* nas linhagens previamente expostas ao itraconazol. Uma linhagem também exibiu aumento da expressão do gene *MDR3*. A menor susceptibilidade e o subcultivo na ausência do antifúngico acarretou alterações no crescimento, na germinação de conídios, na tolerância a diferentes fontes de estresse, na produção de biofilme, na interação com macrófagos e em menor viabilidade fúngica em modelo murino. Estes resultados demonstram que linhagens menos susceptíveis a antifúngicos se comportam de modo diferente das linhagens que não foram expostas ao fármaco, o que resulta, além de mudanças na susceptibilidade, fisiologia e expressão de *ERG11* e *MDR3*, em uma interação diferenciada com macrófagos e em modelo murino. No segundo capítulo, três linhagens de dermatófitos foram expostas ao tratamento com amorolfina e ciclopirox olamina para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxinitrito (PRN). Estas linhagens também foram avaliadas sob tratamento na presença de inibidores de ROS e PRN: sal dissódico do ácido 4,5-di-hidroxi-1,3-benzenodissulfônico monohidratado (Tiron) e 5,10,15,20-tetraquis(4-sulfonatofenil) porfirinato de ferro (III) (FeTPPS). As três linhagens foram susceptíveis a amorolfina e ciclopirox a 0,25 e 2,00 µg/mL, respectivamente. O tratamento com amorolfina e ciclopirox aumentou a produção de ROS e PRN e diminuiu a carga fúngica pós-tratamento. Na presença dos inibidores, a produção de ROS e PRN diminuiu e a carga fúngica aumentou. A combinação entre os antifúngicos e inibidores DETC, 3AT, Tiron, FeTPPS também foi avaliada. As interações foram antagônicas para a combinação de DETC com amorolfina e ciclopirox, sinérgicas para a combinação de amorolfina a FeTPPS e 3AT e indiferentes para as outras combinações. O tratamento com amorolfina e ciclopirox reduziu o conteúdo de ergosterol e aumentou a peroxidação lipídica. A associação de amorolfina aos inibidores reduziu a peroxidação lipídica e elevou o conteúdo de ergosterol. Este perfil também foi observado na associação de ciclopirox ao FeTPPS, o que indica que amorolfina e ciclopirox tem ação antifúngica que envolve como mecanismo de ação também a produção de ROS e PRN contra *T. interdigitale*. Além disso, este conjunto de dados demonstra, primeiro, a relativa facilidade de produção de linhagens com menor

susceptibilidade a antifúngico, o que torna esta questão extremamente preocupante e relevante. Segundo, fica estabelecido um mecanismo de ação paralelo para amorolfina e ciclopirox, o que pode explicar a menor taxa de resistência frente a estes antifúngicos e estabelecer caminhos para novas propostas terapêuticas.

**Palavras-chave:** dermatófito; antifúngico; resistência; resistência cruzada; estresse oxidativo; estresse nitrosativo.

## ABSTRACT

The emergence of resistance to antifungals and the therapeutic failure resulting from this process is an increasingly recurrent fact in clinical practice. Resistance can be defined as a reduction in the effectiveness of a drug against an entire population of fungal cells. For dermatophytes, the resistance mechanisms are still not fully elucidated. Furthermore, the lower incidence of resistance to certain antifungal agents suggests the occurrence of mechanisms of action parallel to those described. Thus, this research evaluated the influence of exposure of dermatophytes to the antifungals terbinafine and itraconazole on fungal susceptibility, virulence and fungus-host interaction *in vitro* and *in vivo*, and analyzed the role of oxidative and nitrosative stress in treatment *in vitro* with amorolfine and ciclopirox olamine. In the first chapter, sixteen wild strains of dermatophytes underwent an adaptation process in medium supplemented with itraconazole or terbinafine and, later, cultivated in medium in the absence of these antifungals. Eleven strains (70.58%) were less susceptible to itraconazole and five (29.41%) to terbinafine. In addition, these strains also exhibited lower susceptibility to other clinical antifungals such as amorolfine, ketoconazole and ciclopirox olamine. Exposure to itraconazole increased the expression of the *ERG11* gene in strains previously exposed to itraconazole. One strain also exhibited increased expression of the *MDR3* gene. The decreased susceptibility and subculture in the absence of the antifungal caused changes in growth, conidia germination, tolerance to different sources of stress, biofilm production, interaction with macrophages and decreased fungal viability in a murine model. These results demonstrate that strains less susceptible to antifungals behave differently from strains that were not exposed to the drug, which results, in addition to changes in the susceptibility, physiology and expression of *ERG11* and *MDR3*, in a differentiated interaction with macrophages and in a murine model. In the second chapter, three strains of dermatophytes were exposed to treatment with amorolfine and ciclopirox olamine to evaluate the production of reactive oxygen species (ROS) and peroxynitrite (PRN). These strains were also evaluated under treatment in the presence of ROS and PRN inhibitors: 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid disodium salt monohydrate (Tiron) and 5,10,15,20-Tetrakis(4-trimethylammoniohenyl) porphyrin (FeTPPS). The three strains were susceptible to amorolfine and ciclopirox at 0.25 and 2.00 µg/mL, respectively. Treatment with amorolfine and ciclopirox increased ROS and PRN production and decreased post-treatment fungal burden. In the presence of inhibitors, the production of ROS and PRN decreased and the fungal burden increased. The combination of antifungals and inhibitors DETC, 3AT, Tiron, FeTPPS was also evaluated. The interactions were antagonistic for the combination of DETC with amorolfine and ciclopirox, synergistic for the combination of amorolfine to FeTPPS and 3AT, and indifferent for the other combinations. Treatment with amorolfine and ciclopirox reduced ergosterol content and increased lipid peroxidation. The association of amorolfine with inhibitors reduced lipid peroxidation and increased ergosterol content. This profile was also observed in the association of ciclopirox to FeTPPS, which indicates that amorolfine and ciclopirox have an antifungal action that also involves the production of ROS and PRN against *T. interdigitale* as a mechanism of action. Furthermore, this dataset demonstrates, first, the relative ease of production of strains with less susceptibility to antifungals, which makes this issue extremely worrisome and relevant. Second, a parallel mechanism of action for amorolfine and ciclopirox is established, which may

explain the lower rate of resistance against these antifungals and establish paths for new therapeutic proposals.

**Keywords:** dermatophyte; antifungal; resistance; cross resistance; oxidative stress; nitrosative stress.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Desenho experimental do fluxograma e dos experimentos realizados no Capítulo 1 deste trabalho .....  | 48 |
| <b>Figura 2.</b> Esquema representativo do processo de seleção de linhagens menos susceptíveis aos antifúngicos itraconazol e terbinafina .....   | 52 |
| <b>Figura 3.</b> Esquema representativo do processo de análise da estabilidade da susceptibilidade das linhagens após 10 passagens em meio ABD na ausência dos antifúngicos itraconazol ou terbinafina (10p) .....  | 53 |
| <b>Figura 4.</b> Efeito da exposição aos antifúngicos e do itraconazol no crescimento dos fungos. Crescimento radial (mm) dos conídios (A, C e E) e do micélio (B, D e F) das linhagens II, II AI, II 10pl, 865, 865 AI, 865 10pl, 917, 917 AI e 917 10pl em ágar batata dextrose (ABD) e na presença de itraconazol (0,25 µg/mL; ABD + ITR) .....  | 76 |
| <b>Figura 5.</b> Efeito da exposição aos antifúngicos e do itraconazol na germinação de conídios. Percentual de conídios germinados para as linhagens (A) II, (B) 865 e (C) 917 e seus respectivos clones AI e 10pl após 24 horas em caldo batata dextrose (CBD) e na presença de itraconazol (0,25 µg/mL; CDB + ITR) .....   | 79 |
| <b>Figura 6.</b> Efeito da exposição aos antifúngicos e do itraconazol na conidiação. Número de conídios (conídios/mL) produzidos pelas linhagens II, II AI e II 10pl após 7 dias em ágar batata dextrose (ABD) .....   | 80 |
| <b>Figura 7.</b> Efeito da exposição aos antifúngicos e do itraconazol no crescimento dos fungos na presença de estressores de parede celular e do estabilizante osmótico sorbitol. Crescimento conidial das linhagens (A) II, (B) 865 e (C) 917 e seus respectivos clones AI e 10pl nas concentrações de 105, 104 e 103 UFC/mL em ágar batata dextrose (ABD) e na presença de caspofungina (CAS), sorbitol (SORB), calcoflúor (CCF) e vermelho congo (congo). Porcentagem do crescimento micelial das linhagens (D) II, (E) 865 e (F) 917 e seus respectivos clones AI e 10pl em CAS, Congo, SORB e CCF em relação ao controle (crescimento em meio ABD) ..... | 81 |
| <b>Figura 8.</b> Efeito da exposição aos antifúngicos na susceptibilidade a compostos e agentes antifúngicos que atuam na membrana celular. (A)   | 84 |

Crescimento de conídios das linhagens II, II AI e II 10pl em ágar batata dextrose (ABD) e na presença de anfotericina B (AMB), cetoconazol (CET), ciclopirox (CIC), itraconazol (ITR), terbinafina (TERB), dodecil sulfato de sódio (SDS) e cloreto de sódio (NaCl). (B) Razão do crescimento micelial das linhagens II, II AI e II 10pl em meio ABD suplementado com AMB, CET, ITR, TERB, SDS, NaCl e amorolfina (AMO) sobre o controle (crescimento em meio ABD). (C) Conteúdo de ergosterol ( $\mu\text{g/mL}$ ) das linhagens II, IIA e II10p e (D) razão do conteúdo de ergosterol das linhagens II AI e II 10pl sobre a linhagem II .....

**Figura 9.** Efeito da exposição aos antifúngicos na susceptibilidade a compostos e a agentes antifúngicos que atuam na membrana celular. (A) Crescimento de conídios das linhagens 865, 865 AI e 865 10pl em ágar batata dextrose (ABD) e na presença de anfotericina B (AMB), cetoconazol (CET), ciclopirox (CIC), itraconazol (ITR), terbinafina (TERB), dodecil sulfato de sódio (SDS) e cloreto de sódio (NaCl). (B) Razão do crescimento micelial das linhagens 865, 865 AI e 865 10pl em meio ABD suplementado com AMB, CET, ITR, TERB, SDS, NaCl e amorolfina (AMO) sobre o controle (crescimento em meio ABD). (C) Conteúdo de ergosterol ( $\mu\text{g/mL}$ ) das linhagens 865, 865A e 86510p e (D) razão do conteúdo de ergosterol das linhagens 865 AI e 865 10pl sobre a linhagem 865 .....

86

**Figura 10.** Efeito da exposição aos antifúngicos na susceptibilidade a compostos e a agentes antifúngicos que atuam na membrana celular. (A) Crescimento de conídios das linhagens 917, 917 AI e 917 10pl em ágar batata dextrose (ABD) e na presença de anfotericina B (AMB), cetoconazol (CET), ciclopirox (CIC), itraconazol (ITR), terbinafina (TERB), dodecil sulfato de sódio (SDS) e cloreto de sódio (NaCl). (B) Razão do crescimento micelial das linhagens 917, 917 AI e 917 10pl em meio ABD suplementado com AMB, CET, ITR, TERB, SDS, NaCl e amorolfina (AMO) sobre o controle (crescimento em meio ABD). (C) Conteúdo de ergosterol ( $\mu\text{g/mL}$ ) das linhagens 917, 917A e 91710p e (D) razão do conteúdo de ergosterol das linhagens 917 AI e 917 10pl sobre a linhagem 917 .....

88

**Figura 11.** Efeito da exposição aos antifúngicos na peroxidação lipídica. Quantificação da peroxidação lipídica das linhagens (A) II, (B) IIAI e (C) II

90

|  |    |
|--|----|
| 10pl .....   |    |
| <b>Figura 12.</b> Efeito da exposição aos antifúngicos na produção de biofilme e matriz extracelular. (A, B, C) Biomassa do biofilme e (D, E e F) matriz extracelular das linhagens II, 865, 917 e seus respectivos clones AI e 10p ...  | 91 |
| <b>Figura 13.</b> Efeito da exposição aos antifúngicos na atividade metabólica de biofilme. (A) Cinética da atividade metabólica do biofilme de II, IIAI e II 10pl após 24, 72 e 120 horas de maturação. Atividade metabólica do biofilme após (B) 24, (C) 72 e (D) 120 horas de atividade .....   | 92 |
| <b>Figura 14.</b> Expressão relativa dos genes (A) ERG11, (B) MDR2 e (C) MDR3 nas linhagens II, IIAI e II 10pl não expostas e expostas ao itraconazol (ITR) por 30 minutos (ITR 30') .....   | 93 |
| <b>Figura 15.</b> Efeito da exposição aos antifúngicos na interação de <i>T. interdigitale</i> e macrófagos e na susceptibilidade ao estresse oxidativo. (A) Índice fagocítico, (B) produção de NO, (C) razão UA/UFC de ROS e (D) de PRN, (E) exocitose (6h), (F) proliferação intracelular (IPR), (G) razão do crescimento micelial das linhagens II, II AI e II 10pl em meio ABD suplementado com peróxido de hidrogênio (HP) sobre o controle (crescimento em ABD) e (H) crescimento de conídios das linhagens II, II AI e II 10pl em meio contendo HP.....   | 95 |
| <b>Figura 16.</b> Efeito da exposição aos antifúngicos na interação de <i>T. interdigitale</i> e macrófagos e na susceptibilidade ao estresse oxidativo. (A) Índice fagocítico, (B) produção de NO, (C) razão UA/UFC de ROS e (D) de PRN, (E) exocitose, (F) proliferação intracelular (IPR), (G) razão do crescimento micelial das linhagens 865, 865 AI e 865 10pl em meio ABD suplementado com peróxido de hidrogênio (HP) sobre o controle (crescimento em ABD) e (H) crescimento de conídios das linhagens 865, 865 AI e 865 10pl em meio contendo HP ..... | 97 |
| <b>Figura 17.</b> Efeito da exposição aos antifúngicos na interação de <i>T. interdigitale</i> e macrófagos e na susceptibilidade ao estresse oxidativo. (A) Índice fagocítico, (B) produção de NO, (C) razão UA/UFC de ROS e (D) de PRN, (E) exocitose, (F) proliferação intracelular (IPR), (G) razão do crescimento micelial das linhagens 917, 917 AI e 917 10pl em meio ABD suplementado com peróxido de hidrogênio (HP) sobre o controle   | 99 |

|  |     |
|--|-----|
| (crescimento em ABD) e (H) crescimento de conídios das linhagens 917, 917 AI e 917 10pl em meio contendo HP .....  |     |
| <b>Figura 18.</b> Efeito da exposição aos antifúngicos em modelo de infecção murino. Recuperação de carga fúngica de animais infectados com as linhagens não expostas aos antifúngicos (NE), AI e 10pl. A recuperação ocorreu 7 dias pós-infecção .....  | 100 |
| <b>Figura 19.</b> Desenho experimental do fluxograma e dos experimentos realizados no Capítulo 2 deste trabalho .....  | 110 |
| <b>Figura 20.</b> Esquema do teste de combinação de drogas. As setas indicam o aumento da concentração de cada agente individualmente e a seta em diagonal indica o aumento da concentração de antifúngico e do inibidor em combinação .....   | 113 |
| <b>Figura 21.</b> Efeito <i>in vitro</i> dos antifúngicos na produção de ROS, PRN e viabilidade celular. Produção de ROS, PRN e viabilidade celular pós-tratamento <i>in vitro</i> com amorolfina (AMO) e ciclopirox olamina (CIC) nos tempos de 2 e 6 horas para as linhagens (A, B, C) <i>T. interdigitale</i> ATCC 9533, (D, E, F) II e (G, H e I) IV .....   | 117 |
| <b>Figura 22.</b> Efeito <i>in vitro</i> dos antifúngicos e inibidores do estresse oxidativo e nitrosativo na produção de ROS, PRN e viabilidade celular. Produção de (A) ROS, (B) PRN e (C) carga fúngica recuperada pós-tratamento <i>in vitro</i> com amorolfina (AMO) e ciclopirox olamina (CIC) na ausência e na presença dos inibidores Tiron (Ti) e FETPPS (Fe) nos tempos de 2 e 6 horas para a linhagem <i>T. interdigitale</i> ATCC 9533 ..... | 120 |
| <b>Figura 23.</b> Efeito <i>in vitro</i> dos antifúngicos e inibidores do estresse oxidativo e nitrosativo na produção de ROS, PRN e viabilidade celular. Produção de (A) ROS, (B) PRN e (C) carga fúngica recuperada pós-tratamento <i>in vitro</i> com amorolfina (AMO) e ciclopirox olamina (CIC) na ausência e na presença dos inibidores Tiron (Ti) e FETPPS (Fe) nos tempos de 2 e 6 horas para a linhagem <i>T. interdigitale</i> II .....        | 122 |
| <b>Figura 24.</b> Efeito <i>in vitro</i> dos antifúngicos e inibidores do estresse oxidativo e nitrosativo na produção de ROS, PRN e viabilidade celular. Produção de (A) ROS, (B) PRN e (C) carga fúngica recuperada pós-tratamento <i>in vitro</i> com amorolfina (AMO) e ciclopirox olamina (CIC) na ausência e na  | 124 |



presença dos inibidores Tiron (Ti) e FETPPS (Fe) nos tempos de 2 e 6 horas para a linhagem *T. interdigitale* IV .....

**Figura 25.** Efeito *in vitro* dos antifúngicos e inibidores do estresse oxidativo e nitrosativo no conteúdo de ergosterol e na peroxidação lipídica. Conteúdo de ergosterol de (A) *T. interdigitale* 9533 e (C) II e peroxidação lipídica de (B) *T. interdigitale* 9533 e (D) II pós-tratamento com amorolfina (AMO) e ciclopirox olamina (CIC) na ausência e na presença dos inibidores Tiron (Ti) e FETPPS (Fe) .....

## LISTA DE QUADROS

|   |    |
|---|----|
| <b>Quadro 1.</b> Relação das amostras utilizadas neste estudo ..... | 49 |
|---|----|

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Relação, sequências e referências dos <i>primers</i> utilizados para qPCR .....   | 61 |
| <b>Tabela 2.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) do itraconazol e terbinafina para diferentes linhagens de <i>T. interdigitale</i> e <i>T. rubrum</i> não expostas (NE) e menos susceptíveis ao itraconazol (AI) e a terbinafina (AT), determinada pelo método de diluição em meio sólido. Os valores de CIM em negrito e entre parênteses indicam o aumento da CIM comparado a respectiva linhagem NE .....  | 67 |
| <b>Tabela 3.</b> Concentração máxima alcançada (CMA) do itraconazol (ITR) e terbinafina (TERB) para diferentes linhagens de <i>T. interdigitale</i> e <i>T. rubrum</i> não expostas (NE) e menos susceptíveis ao itraconazol (AI) e a terbinafina (AT), determinada pelo método de diluição em meio sólido .....   | 68 |
| <b>Tabela 4.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico itraconazol (ITR) para diferentes linhagens de <i>T. interdigitale</i> e <i>T. rubrum</i> não expostas (NE), menos susceptíveis ao itraconazol (AI) e a terbinafina (AT), e após 10 passagens em meio na ausência de itraconazol (10pI) e terbinafina (10pT) determinada pelo método de microdiluição em caldo. Os valores de CIM em negrito e entre parênteses indicam o aumento da CIM comparado a respectiva linhagem NE ..... | 70 |
| <b>Tabela 5.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico amorolfina (AMO) para diferentes linhagens de <i>T. interdigitale</i> e <i>T. rubrum</i> não expostas (NE), menos susceptíveis ao itraconazol (AI) e a terbinafina (AT), e após 10 passagens em meio na ausência de itraconazol (10pI) e terbinafina (10pT) determinada pelo método de microdiluição em caldo. Os valores de CIM em negrito e entre parênteses indicam o aumento da CIM comparado a respectiva linhagem NE .....  | 71 |
| <b>Tabela 6.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico cetoconazol (CTZ) para diferentes linhagens de <i>T. interdigitale</i> e <i>T. rubrum</i> não expostas (NE), menos susceptíveis ao itraconazol (AI) e a terbinafina (AT), e após 10 passagens em meio na ausência de itraconazol (10pI) e terbinafina (10pT) determinada pelo método de microdiluição em caldo. Os valores de CIM em  | 72 |

negrito e entre parênteses indicam o aumento da CIM comparado a respectiva linhagem NE .....

**Tabela 7.** Concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico ciclopirox olamina (CIC) para diferentes linhagens de *T. interdigitale* e *T. rubrum* não expostas (NE), menos susceptíveis ao itraconazol (AI) e a terbinafina (AT), e após 10 passagens em meio na ausência de itraconazol (10pl) e terbinafina (10pT) determinada pelo método de microdiluição em caldo. Os valores de CIM em negrito e entre parênteses indicam o aumento da CIM comparado a respectiva linhagem NE ..... 73

**Tabela 8.** Concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico terbinafina (TERB) para diferentes linhagens de *T. interdigitale* e *T. rubrum* não expostas (NE), menos susceptíveis ao itraconazol (AI) e a terbinafina (AT), e após 10 passagens em meio na ausência de itraconazol (10pl) e terbinafina (10pT) determinada pelo método de microdiluição em caldo. Os valores de CIM em negrito e entre parênteses indicam o aumento da CIM comparado a respectiva linhagem NE ..... 74

**Tabela 9.** Velocidade média (mm/dia) de crescimento das linhagens II, 865, 917 e seus respectivos clones menos susceptíveis (AI) e após 10 passagens em meio na ausência de itraconazol (10pl) em ágar batata dextrose (ABD) e na presença de itraconazol (ABD + ITR). Os valores entre parênteses indicam o percentual de crescimento da linhagem sob o respectivo controle em meio na ausência de itraconazol ..... 77

**Tabela 10.** Concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos clínicos amorolfina e ciclopirox olamina para as linhagens de *T. interdigitale* ATCC 9533, II e IV, determinada pelo método de microdiluição em caldo ..... 116

**Tabela 11.** Índice da concentração inibitória fracionária (ICIF) e natureza da interação entre os inibidores e os antifúngicos ..... 118

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**10pl:** menos susceptíveis ao itraconazol e após 10 passagens em meio ABD

**10pT:** menos susceptíveis a terbinafina e após 10 passagens em meio ABD

**3-AT:** 3-amino-1,2,4-triazol

**ABC:** *ATP-Binding Cassette*

**ABD:** ágar batata dextrose

**AI:** menos susceptível ao itraconazol

**AMB:** anfotericina B

**AMO:** amorolfina

**AT:** menos susceptível a terbinafina

**ATCC:** *American Type Culture Collection*

**BMDM:** macrófagos derivados de medula óssea

**CAS:** caspofungina

**CBD:** caldo batata dextrose

**CET:** cetoconazol

**CEUA:** Comissão de Ética no Uso de Animais

**CIC:** ciclopirox olamina

**CIF:** concentração inibitória fracionária

**CIM:** concentração inibitória mínima

**CLSI:** *Clinical and Laboratory Standards Institute*

**CMA:** concentração máxima alcançada

**Congo:** vermelho congo

**DCFH-DA:** 2,7-dichlorofluorescina diacetato

**DETC:** dietilditiocarbamato de sódio tri-hidratado

**DHR 123:** dihidrorodamina 123

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**FeTPPS:** 5,10,15,20-tetraquis(4-sulfonatofenil) porfirinato de ferro (III)

**HP:** peróxido de hidrogênio

**Hsp:** proteínas de choque térmico

**ICB:** Instituto de Ciências Biológicas

**ICIF:** índice da concentração inibitória fracionária

**IPR:** taxa de proliferação intracelular

**ITR:** itraconazol

**M-CSF:** *macrophage-Colony Stimulating Factor*

**MDR:** *multidrug resistant*

**MFS:** *Major Facilitator Superfamily*

**MOPS:** ácido morfolino-propano-sulfônico

**NaCl:** cloreto de sódio

**NO:** óxido nítrico

**PAS:** ácido periódico de Schiff

**PCR:** reação em cadeia da polimerase

**PDR:** *pleiotropic drug resistance*

**PER:** peroxidase

**PRN:** peroxinitrito

**qPCR:** reação em cadeia da polimerase quantitativa

**ROS:** espécies reativas de oxigênio

**SDS:** dodecil sulfato de sódio

**SFB:** soro fetal bovino

**SIN-1:** cloridrato de 3-morfolinosodnonimina

**SOD:** superóxido dismutase

**SORB:** sorbitol

**TERB:** terbinafina

**Tiron:** sal dissódico do ácido 4,5-di-hidroxi-1,3-benzenodissulfônico monohidratado

**UA:** unidades arbitrárias de fluorescência

**UFC:** unidades formadoras de colônia

**UFMG:** Universidade Federal de Minas Gerais

**XTT:** 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>26</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | <b>27</b> |
|          | 2.1 AS DERMATOFIToses .....   | 27        |
|          | <b>2.1.1 Epidemiologia</b> .....  | <b>29</b> |
|          | 2.2 DERMATÓFITOS .....  | 30        |
|          | <b>2.2.1 A interação dermatófito-hospedeiro</b> .....   | <b>32</b> |
|          | <b>2.2.2 Tratamento medicamentoso</b> .....   | <b>35</b> |
|          | 2.2.2.1 Azólicos .....  | 35        |
|          | 2.2.2.2 Alilaminas .....  | 36        |
|          | 2.2.2.3 Derivados morfolínicos .....  | 37        |
|          | 2.2.2.4 Derivados da hidroxipiridona .....  | 38        |
|          | 2.3 RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS CLÍNICOS .....   | 39        |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVO GERAL</b> .....   | <b>46</b> |
|          | <b>CAPÍTULO I - INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO A ANTIFÚNGICOS CLÍNICOS NA SUSCEPTIBILIDADE, FISIOLÓGIA, VIRULÊNCIA DE <i>Trichophyton</i></b>      |           |
|          | 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 47        |
| <b>4</b> | <b>METODOLOGIA</b> .....  | <b>48</b> |
|          | 4.1 MICRORGANISMOS .....  | 49        |
|          | 4.2 MEIOS DE CULTURA .....  | 50        |
|          | 4.3 PREPARO DO INÓCULO .....  | 50        |
|          | 4.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DOS DERMATÓFITOS AOS ANTIFÚNGICOS TERBINAFINA E ITRACONAZOL POR DILUIÇÃO EM MEIO SÓLIDO .....                 | 51        |
|          | 4.5 SELEÇÃO DE LINHAGENS MENOS SUSCEPTÍVEIS AOS ANTIFÚNGICOS ITRACONAZOL E TERBINAFINA .....  | 52        |
|          | 4.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DAS LINHAGENS MENOS SUSCEPTÍVEIS AOS ANTIFÚNGICOS TERBINAFINA E ITRACONAZOL POR DILUIÇÃO EM MEIO SÓLIDO ..... | 54        |
|          | 4.7 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DOS DERMATÓFITOS AOS  | 54        |

|   |           |
|---|-----------|
| ANTIFÚNGICOS TERBINAFINA E ITRACONAZOL POR<br>MICRODILUIÇÃO EM CALDO .....  |           |
| 4.8 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS NÃO EXPOSTAS, MENOS<br>SUSCEPTÍVEIS AO ITRACONAZOL E A TERBINAFINA E APÓS 10<br>PASSAGENS EM MEIO ABD .....  | 55        |
| <b>4.8.1 Crescimento em meio sólido .....</b>   | <b>55</b> |
| <b>4.8.2 Germinação de conídios .....</b>   | <b>56</b> |
| <b>4.8.3 Conidiação .....</b>   | <b>56</b> |
| <b>4.8.4 Tolerância a xenobióticos .....</b>  | <b>57</b> |
| <b>4.8.5 Quantificação de biomassa do biofilme .....</b>  | <b>57</b> |
| <b>4.8.6 Quantificação de matriz extracelular do biofilme .....</b>   | <b>58</b> |
| <b>4.8.7 Quantificação de atividade metabólica do biofilme .....</b>  | <b>58</b> |
| <b>4.8.8 Quantificação de ergosterol .....</b>  | <b>59</b> |
| <b>4.8.9 Peroxidação lipídica .....</b>   | <b>59</b> |
| 4.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>MDR2</i> , <i>MDR3</i> , <i>ERG11</i><br>E <i>RPB2</i> .....  | 60        |
| <b>4.9.1 Extração do RNA .....</b>  | <b>60</b> |
| <b>4.9.2 Síntese do cDNA .....</b>  | <b>60</b> |
| <b>4.9.3 qPCR .....</b>   | <b>61</b> |
| 4.10 QUESTÕES ÉTICAS .....  | 61        |
| 4.11 INTERAÇÃO DAS LINHAGENS NÃO EXPOSTAS, MENOS<br>SUSCEPTÍVEIS AO ITRACONAZOL E A TERBINAFINA E APÓS 10<br>PASSAGENS EM MEIO ABD COM MACRÓFAGOS DERIVADOS DE<br>MEDULA ÓSSEA (BMDM) ..... | 62        |
| <b>4.11.1 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea<br/>(BMDM) e desafio com linhagens não expostas, menos susceptíveis<br/>e após 10 passagens em meio ABD .....</b>                | <b>62</b> |
| <b>4.11.2 Ensaio de fagocitose .....</b>  | <b>63</b> |
| <b>4.11.3 Quantificação da produção de espécies reativas de<br/>oxigênio (ROS) e peroxinitrito (PRN) pelos macrófagos .....</b>   | <b>64</b> |
| <b>4.11.4 Quantificação da produção de óxido nítrico (NO) .....</b>   | <b>64</b> |
| <b>4.11.5 Atividade fungicida e taxa de proliferação intracelular<br/>(IPR) .....</b>   | <b>64</b> |



|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.11.6 Exocitose</b> .....  | <b>65</b> |
| 4.12 INTERAÇÃO DAS LINHAGENS NÃO EXPOSTAS, MENOS SUSCEPTÍVEIS AO ITRACONAZOL E A TERBINAFINA E APÓS 10 PASSAGENS EM MODELO MURINO DE DERMATOFITOSE .....   | 65        |
| <b>4.12.2 Grupos experimentais</b> .....   | <b>65</b> |
| <b>4.12.2 Tricotomia, infecção e recuperação de carga fúngica da pele</b> .....  | <b>66</b> |
| 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 66        |
| <b>5 RESULTADOS</b> .....  | <b>67</b> |
| 5.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO ITRACONAZOL E TERBINAFINA PARA AS LINHAGENS NÃO EXPOSTAS, AI e AT, DETERMINADA PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM MEIO SÓLIDO .....  | 67        |
| 5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS ANTIFÚNGICOS ITRACONAZOL, AMOROLFINA, CETOCONAZOL, CICLOPIROX OLAMINA E TERBINAFINA PARA AS LINHAGENS NÃO EXPOSTAS, AI, AT, 10pl e 10pT PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO ..... | 69        |
| 5.3 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AOS ANTIFÚNGICOS E DO ITRACONAZOL NO CRESCIMENTO RADIAL DOS DERMATÓFITOS ....  | 75        |
| 5.4 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AOS ANTIFÚNGICOS E DO ITRACONAZOL NA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS .....  | 78        |
| 5.5 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO ITRACONAZOL NA CONIDIAÇÃO .....   | 80        |
| 5.6 EFEITO DE XENOBIÓTICOS E OUTROS ANTIFÚNGICOS NO CRESCIMENTO CONIDIAL E MICELIAL .....  | 80        |
| <b>5.6.1 Xenobióticos que atuam na Parede Celular e Sorbitol</b> .....   | <b>80</b> |
| <b>5.6.2 Xenobióticos que atuam na Membrana Celular e Conteúdo de Ergosterol</b> .....   | <b>83</b> |
| 5.7 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA .....   | 89        |
| 5.8 QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA, MATRIZ EXTRACELULAR E ATIVIDADE METABÓLICA DO BIOFILME .....  | 91        |
| 5.9 EXPRESSÃO GÊNICA .....   | 92        |
| 5.10 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AOS ANTIFÚNGICOS NA INTERAÇÃO COM MACRÓFAGOS E NA SUSCEPTIBILIDADE AO ESTRESSE  | 93        |

|  |            |
|--|------------|
| OXIDATIVO .....  |            |
| 5.11 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AOS ANTIFÚNGICOS NA PATOGENICIDADE EM MODELO MURINO DE DERMATOFITOSE .....  | 100        |
| <b>6 DISCUSSÃO .....</b>   | <b>102</b> |
| <b>7 CONCLUSÃO .....</b>   | <b>107</b> |
| <b>8 PERSPECTIVAS .....</b>  | <b>108</b> |
| <b>CAPÍTULO II – O PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO DOS ANTIFÚNGICOS CLÍNICOS EM <i>Trichophyton interdigitale</i></b>                  |            |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 109        |
| <b>4 METODOLOGIA .....</b>   | <b>110</b> |
| 4.14 MICRORGANISMOS .....  | 111        |
| 4.15 MEIOS DE CULTURA .....  | 111        |
| 4.16 PREPARO DO INÓCULO .....  | 111        |
| 4.17 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DOS DERMATÓFITOS AOS ANTIFÚNGICOS AMOROLFINA E CICLOPIROX OLAMINA POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO .....                | 111        |
| 4.18 TESTE DA ATIVIDADE DOS ANTIFÚNGICOS AMOROLFINA E CICLOPIROX EM COMBINAÇÃO COM INIBIDORES DE ROS OU PRN .                                    | 112        |
| 4.19 PRODUÇÃO DE ROS E PRN NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DOS INIBIDORES E RECUPERAÇÃO DE CARGA FÚNGICA .....  | 114        |
| 4.20 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE ERGOSTEROL E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA .....  | 114        |
| 4.21 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 115        |
| <b>5 RESULTADOS .....</b>  | <b>116</b> |
| 5.12 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) POR MEIO DO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO .....                                     | 116        |
| 5.13 EFEITO <i>in vitro</i> DA AMOROLFINA E DO CICLOPIROX OLAMINA NA PRODUÇÃO DE ROS, PRN E VIABILIDADE CELULAR DE <i>T. interdigitale</i> ..... | 116        |
| 5.14 AVALIAÇÃO DA AÇÃO COMBINADA ENTRE ANTIFUNGICOS E INIBIDORES DE RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO .....                           | 118        |
| 5.15 EFEITO <i>in vitro</i> DO TRATAMENTO COMBINADO DE   | 119        |

|  |            |
|--|------------|
| AMOROLFINA E CICLOPIROX OLAMINA COM INIBIDORES DE ROS E PRN NA PRODUÇÃO DE ROS, PRN E VIABILIDADE CELULAR .....  |            |
| 5.16 EFEITO <i>in vitro</i> DO TRATAMENTO COMBINADO DE AMOROLFINA E CICLOPIROX OLAMINA COM INIBIDORES DE ROS E PRN NO CONTEÚDO DE ERGOSTEROL E NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA ..... | 125        |
| <b>6 DISCUSSÃO .....</b>   | <b>127</b> |
| <b>7 CONCLUSÃO .....</b>   | <b>131</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>132</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>  | <b>152</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente emergência da resistência aos antifúngicos e a falha terapêutica advinda desse processo traz consigo uma problemática em termos de saúde pública.

Para alguns fungos, como os do gênero *Cryptococcus* e *Aspergillus*, os mecanismos de ação pelos quais ocorrem os processos de resistência e os impactos que tais eventos podem trazer para a prática clínica são melhor elucidados. Entretanto, quando se trata de dermatófitos, ainda é necessário compreender como estes fenômenos ocorrem e, sobretudo, demonstrar a influência que eventuais alterações ocorridas no fungo podem ter na interação fungo-hospedeiro.

As dermatofitoses são infecções fúngicas de alta prevalência e incidência causadas por um grupo de fungos que geralmente permanecem localizados nas camadas superficiais da pele, cabelo ou unhas. Acredita-se que a melhor compreensão da relação dermatófito-hospedeiro e do comportamento de linhagens menos susceptíveis a antifúngicos clínicos possibilitarão a proposição de estratégias para minimizar a pressão seletiva que culmina em seu surgimento e, sobretudo, elucidar possibilidades de tratamento direcionadas para estas linhagens.

Além disso, é fundamental estabelecer os mecanismos pelos quais os antifúngicos utilizados para o tratamento da dermatofitose atuam. Diversos estudos descrevem mecanismos de ação principais destes fármacos. Entretanto, informações recentes apontam a existência de mecanismos de ação secundários pelos quais o antifúngico pode atuar. Estes mecanismos podem sugerir caminhos para proposição de moléculas com potencial antifúngico cuja atuação seja direcionada para tais mecanismos.

Assim, esta pesquisa avaliou, *in vitro* e *in vivo*, o papel da resistência em dermatófitos frente aos antifúngicos itraconazol e terbinafina, fármacos utilizados rotineiramente para o tratamento dessas micoses. Ademais, é importante compreender quais mecanismos podem estar envolvidos na ação da amorolfina e ciclopirox olamina, antifúngicos empregados em casos de onicomicose. A compreensão desse fenômeno torna-se fundamental diante do aumento do relato de casos de isolados clínicos que apresentam resistência aos antifúngicos disponíveis na prática clínica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 AS DERMATOFITOSES

As dermatofitoses são doenças fúngicas cutâneas causadas por um grupo de fungos patogênicos denominados dermatófitos, os quais apresentam elevada afinidade pela queratina, com capacidade de metabolizá-la e causar doenças em humanos e animais (MULLER *et al.*, 2013).

Clinicamente, as dermatofitoses se apresentam como micoses cutâneas, caracterizadas por manchas na epiderme que descamam, provocam prurido, inflamação e produção de secreção (KAUR, KASHYAP, BHALLA, 2008). A infecção pode acarretar feridas na pele, couro cabeludo e unhas. A classificação da dermatofitose é, geralmente, realizada com base no sítio anatômico da infecção, podendo ocorrer na pele glabra, em áreas queratinizadas, em folículos pilosos e em unhas (VERMOUT *et al.*, 2008; ZHAN; LIU, 2016). Além da inflamação progressiva e prurido intenso, os sinais podem incluir lesão no folículo piloso, alopecia, eritema e formação de crostas, que ocorrem em qualquer local infectado (MORIELLO, 2004; GORDON *et al.*, 2016), variando a intensidade dos sintomas de acordo com o agente causador, a reação do hospedeiro aos produtos metabólicos fúngicos, a virulência do fungo, o local de desenvolvimento da micose e o estado imunológico do paciente (VERMOUT *et al.*, 2008; BERKER, 2009; REZAEI-MATEHKOLAEI *et al.*, 2013).

Na prática dermatológica, elas estão entre as infecções fúngicas de localização cutânea mais comuns no homem (VENA *et al.*, 2012; HAY *et al.*, 2014; ROUZAUD *et al.*, 2018). Os fungos responsáveis por essas infecções foram, a princípio, classificados nos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Essa classificação taxonômica se baseou em manifestações clínicas, aspectos morfológicos da cultura, parâmetros fisiológicos e microscópicos (SIQUEIRA *et al.*, 2006, GARCIA *et al.*, 2017). Com o advento e avanço das técnicas moleculares, uma nova classificação foi recentemente proposta. Por meio do sequenciamento multilocus, uma reclassificação dos dermatófitos em oito clados filogeneticamente distintos, sendo eles: *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Paraphyton*, *Lophophyton*, *Microsporum*, *Arthroderma* e *Ctenomyces* (DE HOOG *et al.*, 2017; HAYETTE; SACHELI, 2017).

Embora, na maioria das vezes, as dermatofitoses sejam restritas às superfícies da epiderme, estas podem provocar infecções graves com desenvolvimento de granulomas em camadas mais profundas da pele e outros órgãos (WARYCHA *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2019), como ocorre com o granuloma de Majocchi, uma infecção dermatofítica seguida de inflamação granulomatosa (BRESSAN *et al.*, 2011; KANAAN *et al.*, 2015).

O diagnóstico das dermatofitoses é clínico e laboratorial, baseado em técnicas como a interposição da lâmpada de Wood, o exame microscópico direto dos pelos e/ou raspados de pele e unha, os testes bioquímicos e o cultivo micológico de material perilesional (BORBA, 2010; SILVEIRA-GOMES *et al.*, 2013). O método de diagnóstico padrão ouro convencional é o exame microscópico direto do fungo cultivado em ágar Sabouraud dextrose (ASD) por 2 a 3 semanas seguido de identificação pós-cultura por técnica de microcultivo (ABOUL-ELLA; HAMED; ABO-ELYAZEED, 2020).

Microscopicamente, as lesões dermatofíticas mostram padrões variáveis, que vão desde uma lesão não inflamatória, advinda de uma discreta reação em associação com conídios ou hifas no estrato córneo ou nos folículos pilosos a uma intensa reação inflamatória, sem evidência de elementos fúngicos. Partículas fúngicas podem ser visualizadas em cortes histológicos por métodos de coloração especiais, como prata ou com o ácido periódico de Schiff (PAS) (HAO *et al.*, 2020).

No início dos anos 2000, o diagnóstico molecular passou a ser aplicado na identificação das diferentes espécies de dermatófitos. As abordagens moleculares são mais precisas do que a análise baseada apenas em características fenotípicas (GRASER *et al.*, 2000; KAC, 2000; WAGNER *et al.*, 2018). Além disso, o benefício dos testes moleculares utilizados na identificação, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento da região ITS do rDNA, reside no fato de que o conhecimento das espécies e/ou da linhagem pode desempenhar um papel fundamental para lidar com a doença, estabelecendo a fonte de infecção e viabilizando, assim, uma possibilidade de atuar no controle (ARVANITIS *et al.*, 2014; HALLIDAY *et al.*, 2015; BEGUM *et al.*, 2020).

Desta forma, o emprego das técnicas moleculares vieram somar com as outras técnicas disponíveis. Entretanto, a cultura associada ao microcultivo continua sendo o padrão ouro para o diagnóstico das dermatofitoses na prática clínica (ABOUL-ELLA; HAMED; ABO-ELYAZEED, 2020).

### 2.1.1 Epidemiologia

Estima-se que a infecção por dermatófitos afete entre 20 e 25% da população saudável em todo o mundo, representando, em nível global, o tipo mais comum de infecção de pele humana (VENA *et al.*, 2012; HAY *et al.*, 2014; ROUZAUD *et al.*, 2018).

A distribuição dos dermatófitos varia em diferentes países e depende de vários fatores como estilo de vida, características da população, condições socioeconômicas, migração de pessoas, idade, presença de animais domésticos e condições climáticas (HAVLICKOVA; CZAIIKA; FRIEDRICH, 2008). Portanto, a dermatofitose é uma doença cosmopolita, cuja incidência e prevalência são determinadas, principalmente, por fatores de ordem geoclimáticos e sociais (WEESE; FULFORD, 2015).

Epidemiologicamente, as espécies *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* se destacam como os principais agentes etiológicos de dermatofitoses em humanos (REZENDE *et al.*, 2008; AMEEN, 2010).

Estudos sobre a etiologia da onicomicose relataram que *T. rubrum* é a espécie mais comum encontrada na Europa (DRAKENSJÖ; CHRYSANTHOU, 2011; NENOFF *et al.*, 2014), sendo responsável por infecção em mais de 90% dos casos, seguido por *Trichophyton interdigitale* que corresponde a 4 a 8% das infecções (KARDEJEVA *et al.*, 2006).

Em uma pesquisa realizada no Irã com 316 amostras clínicas de dermatófitos, Ansari *et al.* (2016) observaram que *T. interdigitale* foi a espécie mais comumente isolada, representando 49,36% do total de espécies identificadas.

Na África, continente onde grande parcela da população é acometida por dermatofitose, observou-se uma predominância de *Trichophyton violaceum*, seguido de *T. rubrum* (ALEMAYEHU; MINWUYELET; ANDUALEM, 2016; BITEW, 2018). Coulibaly *et al.* (2018) também encontraram *T. violaceum* como a espécie mais prevalente em algumas regiões da África. Já em outras regiões do continente, *T. soudanense*, *Microsporum audouinii* e *M. canis* foram mais prevalentes.

No Brasil, as regiões Sul e Sudeste revelaram uma alta incidência de infecções causadas por *T. rubrum*, seguido por *M. canis* e *T. interdigitale* (PURIM, FREITAS, LEITE, 2009). Corroborando tais dados, um estudo feito no Rio Grande do Sul, em que 100 indivíduos foram avaliados, observou que os dermatófitos foram

os patógenos majoritariamente identificados (84,80%) e o agente mais comumente encontrado foi *T. rubrum*, seguido por *T. interdigitale* (SABADIN *et al.*, 2011).

Sanguino, Jarros e Negri (2019) realizaram um levantamento epidemiológico dos casos de dermatofitose em pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS) atendidos na macrorregião de Maringá, PR, no período de 2009 a 2013 e observaram uma prevalência de 12,54% de infecção causada por dermatófitos, sendo *T. rubrum* a espécie mais prevalente (75,00%), seguido de *T. mentagrophytes* (11,68%) e *M. canis* (7,01%).

Em um estudo conduzido por Costa-Orlandi *et al.* (2012) em Belo Horizonte, MG, com 233 amostras obtidas de suspeitas de dermatomicose, verificou-se que cerca de 10,98% dos casos era causado por *T. rubrum*. Entre os dermatófitos, o gênero *Trichophyton* representou mais de 80% dos isolados, com *T. rubrum* representando 64,29%, seguido de *T. interdigitale* (21,43%).

De forma geral, observa-se que existe uma predominância de *T. rubrum* como principal agente etiológico em várias regiões geográficas do mundo como Reino Unido, Alemanha, Espanha, Japão, Estados Unidos, México e em regiões do Brasil (FOSTER; GHANNOUM; ELEWSKI, 2004; WELSH *et al.*, 2006; BORMAN *et al.*, 2007; LÓPEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2010; SEI, 2012; BUDAK *et al.*, 2013; NENOFF; KRÜGER, 2014). No entanto, outros estudos mostram o aparecimento de outros dermatófitos como principais agentes causadores de infecção, dentre eles, *T. interdigitale* (DABAS *et al.*, 2017; RUDRAMURTHY *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2018).

A importância de se conhecer a epidemiologia e o agente etiológico mais prevalente em cada região é fundamental para a saúde pública, especialmente para estabelecer medidas de controle e prevenção (SUGITA *et al.*, 2006).

## 2.2 DERMATÓFITOS

Os dermatófitos (Onygenales, Arthrodermataceae) são um grupo de fungos filamentosos patogênicos responsáveis por causar a infecção fúngica mais comum em seres humanos (BISHNOI; VINAY; DOGRA, 2018; PAI; GANAVALLI; KIKKERI, 2018).

Estes fungos podem ser classificados quanto a sua predição ecológica em três grupos principais: geofílicos, zoofílicos e antropofílicos. Os geofílicos estão presentes no solo decompondo detritos queratinizados, podendo ser isolados como



saprófitas em pelos de mamíferos silvestres, de animais domésticos ou em penas de aves (CABAÑES, 2001; MORIELLO, 2004; OUTERBRIDGE, 2006). O principal representante do grupo é *Microsporum gypseum* (SEEBACHER, BOUCHARA, MIGNON, 2008; DE HOOG *et al.*, 2017).

Os zoofílicos acometem preferencialmente animais (macacos, cavalos, cães, ovinos, gado, roedores e gatos), podendo, ocasionalmente, infectar o ser humano. Os principais exemplos são *M. canis* e *T. mentagrophytes* (MANCIANTI *et al.*, 2003; DE HOOG *et al.*, 2017), sendo, o último, comum em crianças com dermatofitose oriunda de pequenos roedores como coelhos, hamsters e chinchilas (BECKHEINRICH *et al.*, 2001).

Já os antropofílicos são as espécies que infectam tipicamente o ser humano, de forma que a infecção requer o contato interpessoal e acontece por meio de propágulos infectantes. Seus representantes típicos são *Epidermophyton floccosum* (ZAIAS; REBELL, 2003), *T. rubrum*, *T. interdigitale* e *T. tonsurans* (PEREIRA, MEIRELES, 2001; SEEBACHER, BOUCHARA, MIGNON, 2008; DE HOOG *et al.*, 2017).

A infecção por espécies zoofílicas no ser humano acarreta quadros de infecção aguda, principalmente devido à intensa indução de resposta inflamatória no tecido infectado. Em contrapartida, a infecção por espécies antropofílicas está associada a quadros crônicos de progressão lenta, sugerindo a adaptação do fungo ao hospedeiro humano (WHITE *et al.*, 2008; PERES *et al.*, 2010; HUBE *et al.*, 2015).

Os dermatófitos compreendem uma classe de patógenos primários que requerem a clivagem da queratina presente na pele, nos cabelos e unhas para garantir sua nutrição e consequente sobrevivência. Para tanto, estes fungos secretam uma variedade de enzimas relacionadas a sua virulência e que têm diferente especificidade de substrato, como lipase, protease e celulase (PERES *et al.*, 2010; MÉHUL *et al.*, 2016). Estas enzimas auxiliam na assimilação de nutrientes para garantir o desenvolvimento e sobrevivência do fungo. Além disso, elas hidrolisam componentes estruturais do tecido epidérmico, possibilitando que o patógeno se torne invasivo. Acredita-se que o padrão enzimático secretado pelo dermatófito determine a sua sobrevivência no hospedeiro, bem como a evolução da infecção, a resposta inflamatória e, conseqüentemente, a resposta imune do hospedeiro (JENSEN *et al.*, 2007; GNAT *et al.*, 2018).

Dentre as enzimas secretadas, a queratinase é o fator de virulência mais estudado, sendo responsável por viabilizar a colonização e manutenção do fungo no tecido hospedeiro (MONOD, 2008; PERES *et al.*, 2010; NENOFF *et al.*, 2014). No processo de degradação da queratina, o fungo secreta sulfito como agente redutor, de forma que, na presença de sulfito, as ligações dissulfeto de cisteína que conferem resistência a queratina são diretamente clivadas em cisteína e sulfocisteína, tornando possível que a queratinase degrade efetivamente a queratina (LECHENNE *et al.*, 2007, GRASER *et al.*, 2018).

Além das enzimas, existem outros fatores de virulência descritos para os dermatófitos. Um deles é a produção de uma micotoxina mutagênica conhecida como xantomeginina. A xantomeginina é um fator de virulência descrito para fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo conhecida como um agente de nefropatia que pode acarretar o óbito de animais de criação expostos a fungos de origem alimentar. Para *T. rubrum*, a xantomeginina foi considerada um fator de virulência importante em infecção humana, sendo identificada em pele e unha de indivíduos infectados por esta espécie (GUPTA *et al.*, 2000).

Outro fator considerado importante para a patogênese é a produção de compostos semelhantes a melanina. É bem estabelecido que a melanina é importante para a virulência de outros fungos, como *Cryptococcus* sp. e *Paracoccidioides* sp. (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995; TABORDA *et al.*, 2008). Para os dermatófitos, foi identificada a produção de melanina em *M. gypseum*, *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. Entretanto, ainda não se sabe se esta proteína desempenha um papel relevante na patogênese destes dermatófitos (YOUNGCHIM *et al.*, 2011).

### **2.2.1 A interação dermatófito-hospedeiro**

A patogênese causada por dermatófitos envolve, como evento inicial, a colonização do estrato córneo do hospedeiro por hifas ou artroconídios (BRAND, 2012). Entretanto, para que a colonização tecidual ocorra, o fungo deve ser capaz de superar os mecanismos de defesa do hospedeiro (SABOU *et al.*, 2017). A estrutura física e química da pele, a constante exposição a luz ultravioleta, a temperatura, o pH, a falta de umidade e a presença da microbiota normal tornam o ambiente inóspito para seu crescimento (PERES *et al.*, 2010). Soma-se a essas

características o constante processo de renovação tecidual sofrido pelo estrato córneo que dificulta a adesão do fungo (LI *et al.*, 2013).

Superadas as barreiras iniciais, as estruturas fúngicas devem germinar e penetrar rapidamente no estrato córneo, a fim de evitar que eles sejam eliminados com a descamação epitelial. Estima-se que a interação inicial entre os artroconídios e o estrato córneo ocorra após 3 a 4 horas de contato (BALDO *et al.*, 2012), seguida da implantação na camada superficial e germinação que acontece após um período de aproximadamente 24 horas (DUEK *et al.*, 2004; VERMOUT *et al.*, 2008). Nesse processo, foi demonstrada a importância da presença de estruturas fibrilares que auxiliam a ancoragem do fungo ao tecido, na conexão entre artroconídios adjacentes e, conseqüentemente, na formação de biofilme (KAUFMAN *et al.*, 2007; VERMOUT *et al.*, 2008; BALDO *et al.*, 2012).

Após a adesão ao tecido hospedeiro, o fungo precisa assimilar nutrientes para garantir seu desenvolvimento e sobrevivência e, para tanto, secreta uma variedade de enzimas como proteinases, queratinases, lipases e fosfatases (BROUTA *et al.*, 2002; LENG *et al.*, 2008; MERCER; STEWART, 2019). A ampla maquinaria enzimática dos dermatófitos é um dos fatores de virulência mais bem caracterizados que, além de garantir a nutrição do microrganismo, permite a hidrólise dos componentes estruturais do tecido epidérmico e possibilita que o patógeno se torne invasivo (PERES *et al.*, 2010).

A indução de proteases é fundamental para a patogenicidade, invasividade e eficiente adesão do fungo ao tecido do hospedeiro (BALDO *et al.*, 2008; VERMOUT *et al.*, 2008). O padrão de proteases secretadas pelo dermatófito determina sua sobrevivência no tecido e a evolução da infecção, sendo responsável não apenas por prover nutrientes para o fungo, mas também desencadeando e modulando a resposta imune (PERES *et al.*, 2010; GNAT *et al.*, 2018; KAR; PATEL; FREE, 2019; MERCER; STEWART, 2019).

No tecido do hospedeiro, os dermatófitos ou seus metabólitos induzem uma resposta imune inata mediada por queratinócitos que, por sua vez, ativam mecanismos ou mediadores da resposta imune. Os queratinócitos são os responsáveis por secretar vários fatores solúveis capazes de regular a resposta imune, como fatores de crescimento (bFGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL-1, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8) e fatores estimuladores de colônia (MENDEZ-TOVAR, 2010; BITENCOURT *et al.*, 2018).

Componentes fúngicos como quitina, glucana e glicopeptídeos são os principais antígenos dos dermatófitos e cada um deles pode induzir a diferentes tipos de respostas. Além disso, diferentes espécies de dermatófitos causam respostas imunológicas diferentes. Por exemplo, dermatófitos zoófilos ou geofílicos causam intensa resposta inflamatória (MENDEZ-TOVAR, 2010; KAR; PATEL; FREE, 2019), o que indica que após o estabelecimento da infecção, a manifestação clínica da doença pode variar de acordo com os aspectos do hospedeiro e das espécies envolvidas no processo infeccioso (VERMOUT *et al.*, 2008).

Em contrapartida, os dermatófitos produzem substâncias que diminuem a resposta inflamatória e a proliferação celular, em resposta às defesas do hospedeiro. Por exemplo, Campos *et al.* (2006) sugeriram que o aumento do teor de manana está relacionado a saturação dos receptores de manose na superfície dos macrófagos, o que compromete, conseqüentemente, a internalização do fungo por células fagocíticas do sistema imunológico. Já Martins *et al.* (2019) demonstraram que a exposição de *T. rubrum* a estressores ambientais induziram uma reestruturação e modificação do conteúdo da parede celular fúngico, afetando diretamente diferentes fatores de virulência, reforçando o papel que a parede celular tem para a virulência e susceptibilidade do dermatófito frente a diferentes compostos.

Além disso, Bitencourt *et al.* (2018) demonstraram a produção de vesículas extracelulares por *T. interdigitale* que, dentre outras funções, foram capazes de modular a resposta imune inata do hospedeiro e influenciar a interação do fungo com macrófagos e queratinócitos. Entretanto, por mais que estudos tenham avançado na avaliação dos fatores relacionados a interação patógeno-hospedeiro, os mecanismos moleculares envolvidos na expressão de fatores de virulência, na adaptação dos dermatófitos ao hospedeiro e na natureza da resposta imune que controla as infecções causadas por estes fungos ainda não estão totalmente elucidados (PERES *et al.*, 2010; VENTURINI *et al.*, 2012). Por isso, os modelos de infecção *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* são fundamentais ao elucidar a patogênese das dermatofitoses, bem como as moléculas envolvidas neste processo.

Os modelos de infecção para a realização dos estudos moleculares sobre as interações dermatófito-hospedeiro são limitados, sendo que a avaliação da infecção *in vivo* se restringe às espécies zoofílicas, uma vez que ocorre cura espontânea ou mesmo ausência de colonização pelas espécies antropofílicas (WHITE *et al.*, 2008).

Nesse cenário, modelos que mimetizam e/ou representam os eventos ocorridos no processo de infecção surgem como recursos essenciais para auxiliar no entendimento da dermatofitose. Desta forma, modelos que utilizam amebas de vida livre (DE FARIA *et al.*, 2020), pele de porco (HO; DELGADO-CHARRO; BOLHUIS, 2020), excertos de pele e unha (JACOB *et al.*, 2012; PERES *et al.*, 2016), queratinócitos (DENG *et al.*, 2020), macrófagos (BITENCOURT *et al.*, 2018) e camundongos (VENTURINI *et al.*, 2012; BALTAZAR *et al.*, 2014; CARMO *et al.*, 2020) têm sido importantes na elucidação dos mecanismos envolvidos na interação dermatófito-hospedeiro (CRIADO *et al.*, 2011; BALTAZAR *et al.*, 2014).

## 2.2.2 Tratamento medicamentoso

As dermatofitoses são infecções fúngicas superficiais de difícil tratamento e, mesmo nos casos em que a terapia medicamentosa é adequada ao agente etiológico identificado, nem sempre se obtém cura, sendo frequente a ocorrência de recidivas (JOISH, ARMSTRONG, 2002; COLELLA *et al.* 2006). Logo, para o tratamento das dermatofitoses são utilizados procedimentos terapêuticos tópicos e orais, por vezes de forma combinada, com a finalidade de aumentar a eficácia do tratamento (GUPTA, TU, 2006; GARMENDIA, VIEDMA, ARZA, 2008; KAUR, KASHYAP, BHALLA, 2008).

É comum que o tratamento da dermatofitose se dê por meio da utilização de várias classes químicas de antifúngicos disponíveis no mercado, tais como os azólicos (SANGUINETTI *et al.*, 2007; ANSARI *et al.*, 2016), as alilaminas (ANSARI *et al.*, 2016), os derivados de hidroxipiridinona e de morfolina (SHIRWAIKAR *et al.*, 2008; TAMURA *et al.*, 2014).

### 2.2.2.1 Azólicos

Na terapia antifúngica contra dermatofitose, geralmente há dois grupos de azólicos utilizados: os imidazólicos (cetoconazol, miconazol e clotrimazol) e os triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol). O uso dos imidazólicos é restrito ao tratamento de micoses superficiais e geralmente se apresenta em formulações tópicas, enquanto para o tratamento de infecções crônicas ou graves, itraconazol e fluconazol são mais utilizados, sendo

comercializados geralmente em cápsulas (FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2001, FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2003).

Em um estudo realizado no Irã, em que isolados clínicos de pacientes com dermatofitose foram avaliados, o itraconazol foi o segundo, dentre os fármacos testados, que apresentou melhores resultados contra todos os isolados, apresentando concentração inibitória mínima (CIM) entre 0,004 e 0,5 µg/mL. Nessa pesquisa também foi avaliado o fluconazol, que apresentou CIM para as espécies de dermatófitos testadas entre 4 e 128 µg/mL (ANSARI *et al.*, 2016). Em outro trabalho, Sanguinetti *et al.* (2007) encontraram uma faixa de CIM entre 0,03 e 0,125 mg/L em testes de susceptibilidade de *T. interdigitale* frente ao itraconazol.

De forma geral, esta classe de antifúngicos exerce a sua ação primária através da inibição da síntese do ergosterol, um componente essencial das membranas celulares de fungos, por inibição da enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase (ANDRIOLE, 1999). Quando a enzima é inibida, o acúmulo de precursores causa toxicidade à célula, acarretando ação tipicamente fungicida para fungos filamentosos (VERWEIJ; MELLADO; MELCHERS, 2007). Além disso, Ferreira *et al.* (2013) demonstraram que o itraconazol tem ação antifúngica envolvendo também um mecanismo de ação paralelo relacionado a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Com o aumento da produção de ROS, há uma elevação no conteúdo de peroxidação lipídica, o que altera a permeabilidade da membrana celular e pode ocasionar em morte fúngica.

O ergosterol não está presente em células de mamíferos, tornando-o um alvo seguro para intervenção medicamentosa. Entretanto, há uma questão a ser considerada no tratamento com essa classe de fármacos. Apesar de serem geralmente bem tolerados pelo organismo, os azólicos, em especial o itraconazol, têm demonstrado hepatotoxicidade grave, sendo este um fator importante a ser considerado na terapêutica antifúngica. Neste caso, a hepatotoxicidade é resultado do bloqueio da biossíntese das enzimas do complexo P450 que produzem o colesterol nas células do fígado de mamíferos (BENNET, 2006).

#### 2.2.2.2 Alilaminas

Os antifúngicos da classe das alilaminas têm como mecanismo de ação principal a interferência na biossíntese do ergosterol, através da inibição da

esqualeno epoxidase, uma enzima chave na via de formação deste esteroide de membrana (ESPINEL-INGROFF, 2008; LAM *et al.*, 2016).

Sabe-se que a epoxidação do esqualeno também é um passo essencial na biossíntese de colesterol em mamíferos, no entanto, estudos comparativos sobre esqualeno epoxidase de fígado de rato e fungos mostraram que a alilamina é altamente seletiva para o sistema fúngico (GUPTA; COOPER; LYNDE, 2003). Soma-se a esse cenário o fato de que a terbinafina, um antifúngico desta classe, não exibe afinidade pelo citocromo P450, o que é evidenciado pelo fato de que nenhum dos efeitos secundários conhecidos dos azólicos são observados com frequência em pacientes submetidos a tratamento com terbinafina (BABU *et al.*, 2017). Além disso, Shekhova, Kniemeyer e Brakhage (2017) demonstraram que a produção de ROS é um dos mecanismos de ação da terbinafina contra *Aspergillus fumigatus*.

A terbinafina apresenta um amplo espectro de atividade antifúngica, tendo sua eficácia *in vitro* demonstrada por meio de sua ação fungicida contra dermatófitos (McCLELLAN, WISEMAN, MARKHAM, 1999), sendo o fármaco mais utilizado para o tratamento das onicomicoses, uma vez que apresenta alta eficácia neste tipo de micose (GARMENDIA, VIEDMA, ARZA, 2008). As alilaminas são fármacos comercializados sobre a forma de cremes ou de comprimidos (SILVA, 2010).

A atividade da terbinafina é reafirmada pelos dados apresentados pelo estudo de Ansari e colaboradores (2016), em que foi observado que, dentre os antifúngicos testados, a terbinafina foi o que apresentou maior potencial, exibindo uma faixa de CIM entre 0,002 e 0,25 µg/mL.

### 2.2.2.3 Derivados morfolínicos

A amorolfina, um fármaco derivado da morfolina e usualmente comercializado em forma de esmaltes, atua na inibição da produção do ergosterol da membrana celular do fungo, por meio do bloqueio de duas etapas sucessivas da biossíntese deste composto, mediadas pelas enzimas  $\Delta 14$ -redutase e  $\Delta 7$ - $\Delta 8$  isomerase ((SHIRWAIKAR *et al.*, 2008; TABARA *et al.*, 2015). Portanto, é uma substância de amplo espectro e elevada atividade antifúngica para o tratamento da onicomicose. Ensaio clínico relatam que taxa de cura de onicomicoses tratadas com amorolfina varia entre 60 e 76% (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2010).

A susceptibilidade *in vitro* de diferentes linhagens de dermatófitos frente a amorolfina foi testada por Tamura *et al.* (2014). Para *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, a CIM variou entre 0,12 e 0,50 µg/mL. Já para *M. canis* e *M. gypseum*, a CIM variou entre 0,06 e 0,25 µg/mL. Em um estudo mais amplo, Wiederhold *et al.* (2014) também avaliaram o perfil de 308 linhagens de *T. rubrum* frente a amorolfina e observaram uma CIM variando entre 0,008 e 0,50 µg/mL.

A relação entre susceptibilidade fúngica e estresse oxidativo resultante da exposição a amorolfina ainda não está bem estabelecida. Estudos anteriores demonstraram que *Candida albicans* e *C. dubliniensis* respondem ao estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio aumentando a expressão de genes relacionados a transportadores de drogas, como *MDR1* e *CDR1*. Para *C. albicans*, o aumento da expressão destes genes resulta em redução da susceptibilidade frente a benomil, diferentes azólicos e a amorolfina (HARRY *et al.*, 2005; RAJESWARY *et al.*, 2007; SANGLARD; COSTE; FERRARI, 2009). Já em *C. dubliniensis*, a inativação de *MDR1* não resulta em aumento da susceptibilidade a amorolfina (WIRSCHING *et al.*, 2001). Desta forma, é possível que a redução da susceptibilidade fúngica frente ao estresse oxidativo seja espécie-dependente.

#### 2.2.2.4 Derivados da hidroxipiridona

Fármacos derivados da hidroxipiridona, como o ciclopirox olamina e a piroctona olamina, são substâncias que atuam como bloqueadoras da reprodução celular através da inibição da absorção de potássio, fosfato e aminoácidos e por meio da quelação de cátions polivalentes como  $Fe^{3+}$  e a consequente inibição de enzimas metalo-dependentes responsáveis pela degradação de peróxidos tóxicos na célula fúngica (GUPTA *et al.*, 2000; MARTINEZ-ROSSI *et al.*, 2008; TABARA *et al.*, 2015). Na formulação em creme, esmalte ou gel, a atividade desses fármacos é observada principalmente para dermatófitos (BELLMAN, 2007; CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2010).

Estudos demonstraram que o ciclopirox olamina possui atividade citoprotetora e anti-inflamatória para diferentes tipos celulares (REGDON *et al.*, 2021) e, em muitos casos, essa ação está envolvida na regulação do estresse oxidativo. Por exemplo, ciclopirox leva a morte de células de câncer colorretal por meio da indução



do estresse oxidativo (Qi *et al.*, 2020), sugerindo um possível mecanismo de ação do fármaco que envolve o aumento da produção de ROS.

Azambuja *et al.* (2014) determinaram o perfil de susceptibilidade de doze linhagens de *T. rubrum* contra o antifúngico ciclopirox olamina e observaram uma CIM variando entre 0,06 a 0,50 µg/mL. Para *T. rubrum*, a CIM do ciclopirox foi de 0,03 a 1,00 µg/mL e para *T. mentagrophytes*, de 0,06 a 0,50 µg/mL (WIEDERHOLD *et al.*, 2014).

### 2.3 RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS CLÍNICOS

A resistência aos antifúngicos pode ser vislumbrada sob duas abordagens distintas: clínicas e laboratoriais (YANG; LO, 2001; SHAPIRO *et al.*, 2011). Do ponto de vista clínico, a resistência à droga é a persistência ou a progressão de uma infecção, apesar da terapia antimicrobiana adequada (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008; FERREIRA; SANTOS, 2017).

No laboratório, por sua vez, a resistência é avaliada por meio do ensaio de determinação da CIM, cuja metodologia de execução e análise de resultados são definidos por protocolos propostos pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (YANG; LO, 2001; SHAPIRO *et al.*, 2011).

Neste contexto, é importante esclarecer os conceitos de resistência e heteroresistência. Estes termos têm recebido diferentes significados e as definições variam no estudo para bactérias e fungos, visto que os métodos empregados mudam consideravelmente entre pesquisadores. Neste estudo, será utilizado o conceito de resistência como uma redução da eficácia de um fármaco frente a toda uma população de células fúngicas (GEFEN; BALABAN, 2009; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012; BRAUNER *et al.*, 2016), visto que o fungo exibe capacidade de crescimento em concentrações elevadas do antifúngico (SCORZONI *et al.*, 2017).

Para as dermatofitoses, a resistência usualmente está associada a automedicação, visto que a própria infecção é favorável ao auto-tratamento, geralmente sem acompanhamento médico. Essa situação é uma grande problemática e uso inadequado dos antifúngicos prescritos ou mesmo devido a uma administração do fármaco durante longos períodos (SIONOV *et al.*, 2010; NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2012). Esse problema é ainda maior em países em

que esteróides tópicos são prescritos ou indicados em associação com alguns antifúngicos, como ocorre na Índia (KHURANA; SARDANA; CHOWDHARY, 2019). Os esteróides têm ação protetora da membrana, o que pode minimizar a ação dos antifúngicos cujo mecanismo de ação se dá, geralmente, a nível de membrana. Por isso, é de se considerar a contribuição que a automedicação tem para o fracasso da eliminação do agente fúngico e para o estímulo do crescimento de linhagens menos susceptíveis (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008).

Por outro lado, a heterorresistência é definida como uma resistência a um antimicrobiano específico expresso por uma população que geralmente é suscetível com base nos pontos de corte do teste de suscetibilidade *in vitro* (EL-HALFAWY; VALVANO, 2015; FERREIRA; SANTOS, 2017). O evento ocorre quando uma população fúngica exibe fenótipos de resistência heterogêneos, fazendo com que uma pequena parte do grupo seja menos sensível a um determinado antifúngico (SHAPIRO *et al.*, 2011).

Este tipo de resistência é, geralmente, dependente de alteração na expressão gênica, conforme observado na resistência exibida por linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* frente ao fluconazol (SANTOS *et al.*, 2014; ROSSI *et al.*, 2016) e de *C. gattii* ao agroquímico benomil (CARNEIRO *et al.*, 2020). Acredita-se ainda, que essas subpopulações resistentes podem se adaptar a concentrações crescentes dos fármacos de modo gradual e que, após o crescimento na ausência do antifúngico, a susceptibilidade original pode ser restaurada (SHAPIRO *et al.*, 2011; BASTOS *et al.*, 2018; CARNEIRO *et al.*, 2020).

Em dermatófitos, Ghelardi *et al.* (2014) demonstraram que a exposição *in vitro* repetida de *T. rubrum* a doses sub-letais de diferentes antifúngicos pode levar à seleção de linhagens capazes de sobreviver em concentrações mais altas dos antifúngicos. No entanto, na ausência de tal pressão, uma fração das linhagens tem sua susceptibilidade original recuperada, caracterizando um evento de heterorresistência.

Os fungos respondem a estímulos ambientais por meio da ativação de diversas vias de transdução de sinais responsáveis por assegurar o funcionamento dos mecanismos fisiológicos que possibilitam sua adaptação a condições de estresse, a respostas de defesa e a tolerância celular. Vários mecanismos bioquímicos contribuem para o fenótipo de resistência aos antifúngicos. A maior parte envolve uma diminuição na absorção de drogas, alterações estruturais no sítio

alvo e um aumento de efluxo de drogas (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008; SARDANA; KHURANA, 2018).

De um ponto de vista molecular, as alterações bioquímicas podem advir de um processo de amplificação, transferência ou eliminação de genes, mutações pontuais, epigenética, modificações pós-traducionais e esses efeitos podem ocorrer sobre genes diretamente envolvidos no combate aos compostos citotóxicos (TAMAYO *et al.*, 2013; TIWARI *et al.*, 2015).

Por exemplo, Persinoti *et al.* (2014) demonstraram, por meio de análise de sequenciamento de RNA (RNA-Seq), que o antimicrobiano acriflavina regula positivamente os genes envolvidos na desintoxicação celular em *T. rubrum*, incluindo genes que codificam moléculas responsáveis por atuar contra o estresse oxidativo. De maneira similar, Mendes *et al.* (2018) desafiaram *T. rubrum* com o antifúngico ácido undecanóico e observaram uma regulação positiva de vários genes envolvidos na codificação de enzimas do sistema antioxidante fúngico, como catalase, superóxido dismutase, peroxidase, glutaciona transferase e glutaciona peroxidase.

A produção de proteínas de choque térmico (Hsp) também é um fator de resistência a antifúngicos. As proteínas de choque térmico participam de diversos processos como transcrição, tradução, modificações pós-traducionais, dobragem, agregação e desagregação de proteínas (TIWARI *et al.*, 2015). Essas proteínas podem ser induzidas quando as células fúngicas estão sob condições estressantes, como a exposição a antifúngicos ou mesmo condições de temperatura e pH extremas (LEACH *et al.*, 2012; TAMAYO *et al.*, 2013; TIWARI *et al.*, 2015).

Para *T. rubrum*, foi observada regulação positiva na expressão dos genes que codificam a proteína Hsp90 quando o fungo foi exposto a acriflavina e a terbinafina ou passou por mudanças de temperatura bruscas (JACOB *et al.*, 2015; MARTINEZ-ROSSI *et al.*, 2016). Em contrapartida, a inibição da Hsp90 prejudicou o crescimento deste fungo em fragmentos de unha humano e alterou a modulação de outros genes *hsp*, sugerindo que a Hsp90 está envolvida na patogenicidade fúngica e no perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em *T. rubrum* (JACOB *et al.*, 2015).

Alguns trabalhos têm abordado a ocorrência de mecanismos de resistência à antifúngicos em dermatófitos, e a maior parte deles envolve o fungo *T. rubrum* (CERVELATTI *et al.*, 2006; FACHIN *et al.*, 2006; MANZANO-GAYOSSO *et al.*, 2008; OSBORNE *et al.*, 2006; PAIÃO *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2007; YAMADA *et al.*, 2017).

Entretanto, eventos de resistência têm sido evidenciado em outros agentes, como *T. interdigitale* (YAMADA *et al.*, 2017), *T. mentagrophytes* (MANZANO-GAYOSSO *et al.*, 2008) e *T. tonsurans* (MANZANO-GAYOSSO *et al.*, 2008).

Estudos apontam mecanismos de resistência a terbinafina que envolvem a modificação da enzima alvo por mutações pontuais (OSBORNE *et al.*, 2005; OSBORNE *et al.*, 2006; YAMADA *et al.*, 2017), aumento do efluxo da droga devido a superexpressão de bombas de efluxo (FACHIN *et al.*, 2006; PAIÃO *et al.*, 2007) e a superexpressão da enzima salicilato mono-oxigenase o que, acredita-se, atue acelerando o processo de degradação da droga (GRAMINHA *et al.*, 2004).

Por exemplo, Santos *et al.* (2018) tornaram uma linhagem de *T. rubrum* resistente à terbinafina. A resistência foi conferida por meio de transformação utilizando múltiplas cópias de *salA*, o gene que codifica a enzima salicilato mono-oxigenase. Neste caso, a expressão elevada de *salA* foi associada ao aumento da resistência para a terbinafina, sugerindo sua importância para a resistência e resposta a terbinafina. Outro fato importante observado no estudo foi que o fenótipo resistente foi revertido após a linhagem transformada ser subcultivada na ausência de terbinafina por várias gerações, o que levou a perda dos plasmídeos contendo o gene *salA*.

A resistência para a terbinafina em dermatófitos tem sido associada a mutação na enzima esqualeno epoxidase. Yamada *et al.* (2017) avaliaram a susceptibilidade de 2.056 isolados de *T. rubrum* e *T. interdigitale* frente a terbinafina e observaram que menos de 1% apresentaram perfil de resistência para este antifúngico. Ao avaliar a sequência gênica da enzima, mutações pontuais foram encontradas em quatro posições responsáveis pelo fenótipo de resistência.

De fato, linhagens de *T. rubrum* mutadas em diferentes resíduos de aminoácidos da enzima foram responsáveis pelo perfil de menor susceptibilidade a terbinafina (OSBORNE *et al.*, 2005). Na prática, essas mutações levam a alterações estruturais e menor capacidade de ligação da terbinafina à proteína, sem causar disfunção na biossíntese de ergosterol (MARTINEZ-ROSSI *et al.*, 2008; YAMADA *et al.*, 2017; SCHOSLER *et al.*, 2018).

Para os azólicos, fármacos comumente utilizados na prática clínica para o tratamento de dermatofitoses, foram estabelecidos mecanismos de resistência por meio do aumento do efluxo da droga (CERVELATTI *et al.*, 2006; FACHIN *et al.*, 2006; PAIÃO *et al.*, 2007) e da superexpressão da lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase (YU *et*

*al.*, 2007). A superexpressão da enzima faz com que seja necessária uma quantidade maior de moléculas azólicas para haver efetividade e inibir o crescimento do microrganismo (CANNON *et al.*, 2009; ZAVREL; WHITE, 2015).

De forma geral, o evento mais comum está relacionado ao aumento de efluxo da droga do meio intracelular para o meio extracelular, tendo sua ocorrência evidenciada para diferentes classes de antifúngicos, como a griseofulvina (CERVELATTI *et al.*, 2006; FACHIN *et al.*, 2006; PAIÃO *et al.*, 2007), anfotericina B (YU *et al.*, 2007) e a acriflavina (FACHIN *et al.*, 2006; PAIÃO *et al.*, 2007).

Acredita-se que o aumento do efluxo de drogas se dê em decorrência da superexpressão de bombas de efluxo pertencentes aos complexos proteicos ABC (*ATP-Binding Cassette*) e MFS (*Major Facilitator Superfamily*) (CANNON *et al.*, 2009; SHAPIRO *et al.*, 2011; KHANDELWAL *et al.*, 2016).

A superfamília ABC abrange três famílias relacionadas ao efluxo de compostos tóxicos: a MDR (do inglês “*Multidrug resistance*” – resistência a múltiplas drogas), a proteína associada a MDR (MRP - *Multidrug Resistance-associated Protein*) e as famílias de resistência aos medicamentos pleiotrópicos (PDR – *Pleiotropic Drug Resistance*) (COLEMAN; MYLIONAKIS, 2009).

A análise da sequência genômica de diferentes dermatófitos revelou um grupo homogêneo dos transportadores do tipo ABC, sugerindo uma baixa diversidade genética com apenas alguns genes exclusivos para cada espécie analisada (BURMESTER *et al.*, 2011; MARTINEZ *et al.*, 2012). Tal fato indica que apesar dos fatores fenotípicos e da singularidade adaptativa verificada para cada espécie, os genes que codificam estes transportadores atuam de modo equivalente (GADZALSKI *et al.*, 2016).

O estudo das bombas de efluxo em um isolado clínico de *T. rubrum* submetido a um tratamento mutagênico demonstrou que o fungo foi capaz de apresentar resistência *in vitro* simultaneamente à griseofulvina e ao tioconazol, sugerindo um fenômeno de resistência a múltiplas drogas (FACHIN; MAFFEI; MARTINEZ-ROSSI, 1996; PEREIRA; FACHIN; MARTINEZ-ROSSI, 1998).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular e a descoberta dos genes *TruMDR1* e *TruMDR2* em *T. rubrum* que codificam diferentes bombas de efluxo do tipo ABC, tornou-se possível compreender que a superexpressão do gene *TruMDR1* frente à vários medicamentos não relacionados estruturalmente sugere sua participação em eventos de efluxo de drogas no fungo (CERVELATTI *et al.*, 2006).

Além disso, quando o fungo foi exposto a antifúngicos como a griseofulvina, ao benomil e a vários azólicos, foi possível observar um aumento na transcrição do gene *TruMDR2* (PAIÃO *et al.*, 2007), o que configura um mecanismo de resistência cruzada. A resistência cruzada ocorre quando um mecanismo de resistência referente a uma droga também propicia resistência a outras moléculas de diferentes grupos químicos (SNELDERS *et al.*, 2012; FARIA-RAMOS *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2016; BASTOS *et al.*, 2018). Desta forma, quando um microrganismo é exposto a distintas pressões, um mecanismo de resistência a uma determinada droga, que foi selecionado evolutivamente, pode conferir resposta a uma outra droga quimicamente diferente (KRAAIJEVELD *et al.*, 2012). Mais recentemente Monod *et al.* (2019) demonstraram elucidaram outro transportador do tipo ABC em *T. rubrum*: o *TruMDR3*. No estudo, foi verificado que a superexpressão do gene está diretamente associada ao perfil de resistência de *T. rubrum* frente a azólicos.

De modo similar, Kano (2021) demonstrou o aumento na expressão gênica de *MDR4* e *PDR1* em linhagens de *Trichophyton indotineae* resistentes a terbinafina, demonstrando que as bombas de efluxo codificadas por estes diferentes genes podem estar envolvidas na menor susceptibilidade ao antifúngico.

A organização das células fúngicas é outro fator que pode ser importante no perfil de resistência e/ou tolerância aos antifúngicos. Por exemplo, a estruturação das células em biofilmes está associada a um aumento da resistência à terapia antifúngica (COSTA-ORLANDI *et al.*, 2014).

Os biofilmes possuem uma organização complexa em que as células fúngicas estão envolvidas em uma matriz extracelular, o que lhes confere proteção física, visto que a estrutura protege a comunidade microbiana contra drogas e resposta imunológica do hospedeiro. Além disso, esse perfil de organização contribui para o surgimento de células persistentes, uma subpopulação capaz de tolerar concentrações mais altas de medicamentos (FANNING; MITCHELL, 2012; ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017). Acredita-se que o biofilme atua como fonte de persistência e resistência antifúngica em casos de onicomicose (BURKHART; BURKHART; GUPTA, 2002; GUPTA; DAIGLE; CARVIEL, 2016). Costa-Orlandi *et al.* (2014) demonstram a capacidade de dermatófitos formarem biofilme *in vitro*, assim como Brilhante *et al.* (2017) reproduziram essa organização em um modelo *in vitro* de onicomicose utilizando fragmentos de unha.

O papel do gene *stuA* foi avaliado na maturação de biofilme de *T. interdigitale* (BITENCOURT *et al.*, 2021). Os autores demonstraram que linhagens nocauteadas para *stuA* apresentaram maior tempo de maturação de biofilme quando comparado a linhagem selvagem. Acredita-se que esse perfil está relacionado a ocultação de ligantes da parede celular, o que pode impactar no reconhecimento desta linhagem pelo hospedeiro (KERNIEN *et al.*, 2017).

A produção de artroconídios por dermatófitos também é associada a resistência aos antifúngicos. Artroconídios são produzidos pela fragmentação das hifas e são considerados como principal modo de transmissão da dermatofitose (GUPTA; KOHLI, 2003), sendo mais resistentes aos antifúngicos quando comparado a hifas (ARRESE; PIERARD-FRANCHIMONT; PIERARD, 2001) e aos microconídios (COELHO *et al.*, 2008).

Portanto, salienta-se que a resistência a uma droga particular pode ocorrer por mais de um mecanismo e, provavelmente, sob certas circunstâncias, eles são ativados simultaneamente (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008).

### 3 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta tese foi avaliar a influência da exposição a antifúngicos clínicos na susceptibilidade, fisiologia, virulência e estresse oxidativo e nitrosativo em agentes causadores de dermatofitose.

No intuito de facilitar a leitura do documento, o presente trabalho foi subdividido em dois capítulos. No primeiro capítulo, serão contemplados os aspectos relativos à caracterização e à interação patógeno-hospedeiro de linhagens de dermatófitos com diferentes perfis de susceptibilidade aos antifúngicos itraconazol e terbinafina. Já no segundo capítulo, será abordado o papel do estresse oxidativo e nitrosativo dos antifúngicos clínicos amorolfina e ciclopirox olamina no tratamento de linhagens do dermatófito *Trichophyton interdigitale*. Os objetivos específicos de cada capítulo serão apresentados em suas respectivas seções.



## **CAPÍTULO I - INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO A ANTIFÚNGICOS CLÍNICOS NA SUSCEPTIBILIDADE, FISIOLOGIA, VIRULÊNCIA DE *Trichophyton***

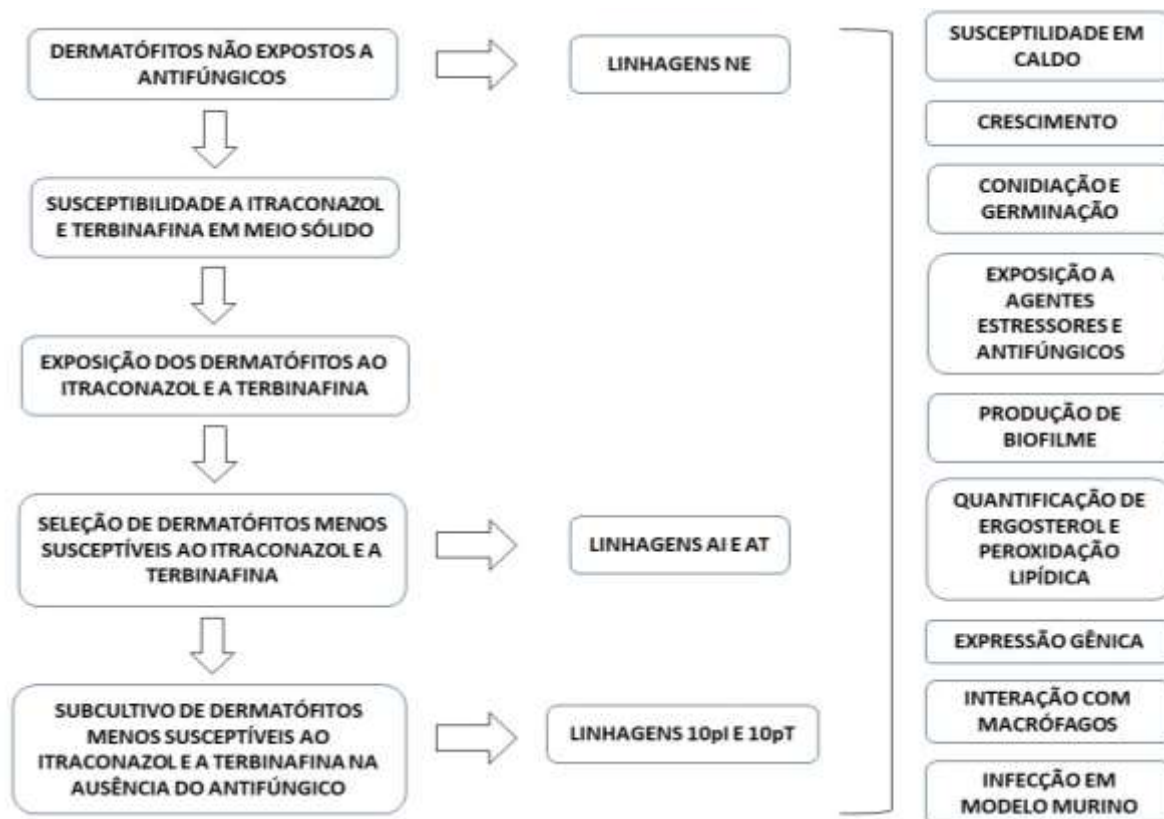
### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o perfil de susceptibilidade de linhagens de dermatófitos aos antifúngicos itraconazol e terbinafina em meio sólido e em caldo;
- Selecionar linhagens de dermatófitos menos susceptíveis aos antifúngicos itraconazol e terbinafina;
- Selecionar linhagens de dermatófitos menos susceptíveis após 10 passagens em meio na ausência do antifúngico;
- Avaliar a influência da exposição aos antifúngicos na germinação dos conídios, na conidiação e no crescimento dos dermatófitos na ausência e presença dos antifúngicos;
- Avaliar a influência da exposição aos antifúngicos na resistência cruzada a outros antifúngicos e a interferência destas drogas na germinação de conídios e crescimento do fungo;
- Avaliar o crescimento conidial e micelial das linhagens na presença de dodecil sulfato de sódio, cloreto de sódio, vermelho congo, calcoflúor, peróxido de hidrogênio e sorbitol;
- Avaliar e comparar a expressão de genes *MDR2*, *MDR3* e *ERG11* entre as diferentes linhagens;
- Avaliar a influência da resistência na patogenicidade dos dermatófitos, como na formação de biofilme, interação com macrófagos e em modelo de infecção murino.

## 4 METODOLOGIA

O fluxo experimental e o resumo das metodologias empregadas no Capítulo 1 estão descritas no esquema representativo abaixo (Figura 1).

**Figura 1.** Desenho experimental do fluxograma e dos experimentos realizados no Capítulo 1 deste trabalho.



Inicialmente, a susceptibilidade de linhagens de *Trichophyton* que não foram previamente expostas (NE) aos antifúngicos foi determinada em meio sólido para itraconazol e terbinafina. Em seguida, os dermatófitos foram expostos a concentrações crescentes de itraconazol ou terbinafina, resultando na seleção de linhagens menos susceptíveis a itraconazol (AI) e terbinafina (AT). Então, as linhagens AI e AT foram subcultivadas por 100 dias na ausência dos antifúngicos, originando as linhagens menos susceptíveis ao itraconazol e subcultivadas por 10 passagens na ausência do itraconazol (10pi) e menos susceptíveis a terbinafina e subcultivadas por 10 passagens na ausência da terbinafina (10pT).

Na sequência, foi determinada a susceptibilidade das linhagens NE, AI, AT, 10pi e 10pT em caldo. Com base no perfil de susceptibilidade, algumas linhagens

foram selecionadas para os ensaios subsequentes. Estes experimentos avaliaram o crescimento, a conidiação, a germinação, a exposição a agentes estressores e antifúngicos, a produção de biofilme, o conteúdo de ergosterol e de peroxidação lipídica, a expressão gênica, a interação com macrófagos e a infecção em modelo murino de dermatofitose.

#### 4.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas dezesseis linhagens de dermatófitos pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG).

Para a espécie *T. interdigitale*, foi utilizada a amostra de referência ATCC 9533 e dez isolados clínicos. Para *T. rubrum*, utilizou-se a linhagem de referência ATCC 28189 e quatro isolados clínicos, conforme relacionado no quadro abaixo.

**Quadro 1.** Relação das amostras utilizadas neste estudo.

| Número | Amostra    | Espécie                            | Origem                |
|--------|------------|------------------------------------|-----------------------|
| 1      | ATCC 9533  | <i>Trichophyhton interdigitale</i> | Amostra de referência |
| 2      | TM I       | <i>Trichophyhton interdigitale</i> | Isolado clínico       |
| 3      | TM II      | <i>Trichophyhton interdigitale</i> | Isolado clínico       |
| 4      | TM III     | <i>Trichophyhton interdigitale</i> | Isolado clínico       |
| 5      | TM IV      | <i>Trichophyhton interdigitale</i> | Isolado clínico       |
| 6      | TM 312     | <i>Trichophyhton interdigitale</i> | Isolado clínico       |
| 7      | TM 716     | <i>Trichophyhton interdigitale</i> | Isolado clínico       |
| 8      | TM 786     | <i>Trichophyhton interdigitale</i> | Isolado clínico       |
| 9      | TM 855     | <i>Trichophyhton interdigitale</i> | Isolado clínico       |
| 10     | TM 865     | <i>Trichophyhton interdigitale</i> | Isolado clínico       |
| 11     | TM 917     | <i>Trichophyhton interdigitale</i> | Isolado clínico       |
| 12     | ATCC 28189 | <i>Trichophyhton rubrum</i>        | Amostra de referência |
| 13     | TR III     | <i>Trichophyhton rubrum</i>        | Isolado clínico       |
| 14     | TR 320     | <i>Trichophyhton rubrum</i>        | Isolado clínico       |
| 15     | TR 855     | <i>Trichophyhton rubrum</i>        | Isolado clínico       |
| 16     | TR 916     | <i>Trichophyhton rubrum</i>        | Isolado clínico       |

**ATCC:** American Type Culture Collection

O estoque das culturas foi mantido em Castellani (CASTELLANI, 1939) a temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Previamente a cada experimento, as linhagens foram repicadas a partir das amostras armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para placas de Petri contendo meio ágar batata dextrose (ABD).

## 4.2 MEIOS DE CULTURA

Os meios ABD e caldo batata dextrose (CBD) foram utilizados para repique das culturas fúngicas utilizadas nos ensaios. Para o processo de seleção das linhagens menos susceptíveis e para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por meio do método de microdiluição em meio sólido, foi utilizado o meio ABD suplementado com os antifúngicos itraconazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e terbinafina (Sigma-Aldrich), em concentrações dependentes da CIM.

O meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), desenvolvido no *Roswell Park Memorial Institute*, pH 7,0 tamponado com ácido morfolino-propano-sulfônico (MOPS) 0,165 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) foi utilizado para a determinação da CIM por meio do método de microdiluição em caldo, de acordo com o documento M-38-A2 estabelecido pelo *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI).

Para os ensaios que envolveram cultura de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM), foi utilizado o meio RPMI 1640 (HyClone, LGC Biotecnologia) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica e 30% de sobrenadante de cultura de células L-929.

## 4.3 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo fúngico foi preparado a partir de culturas de dermatófitos incubadas por 7 dias a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  em tubos contendo meio ABD inclinado para a produção de conídios.

As colônias de fungos foram cobertas com 5 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl) acrescida de 1% de Tween 80 para obtenção de uma suspensão. A suspensão foi homogeneizada em vórtex e a mistura de fragmentos de conídios e hifas filtrada em filtros Qualy (14  $\mu\text{m}$ ; São José dos Pinhais, PR, Brasil), que retêm

fragmentos de hifas e permitem a passagem apenas dos microconídios. Em seguida, o inóculo foi quantificado em hemocitômetro e ajustado de acordo com a concentração previamente estabelecida para cada ensaio.

Para o ensaio de determinação da CIM por microdiluição em meio RPMI 1640, a quantificação se deu por meio do ajuste das densidades das suspensões em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 520 nm e uma transmitância de 70 a 72%, que corresponde à concentração de  $2 \times 10^6$  a  $4 \times 10^6$  UFC/mL. Em seguida, as suspensões ajustadas foram homogeneizadas durante 15 segundos em vórtex, diluídas na proporção 1:50 em meio RPMI 1640, para se obter o inóculo 2x concentrado ( $4 \times 10^4$  a  $8 \times 10^4$  conídios/mL). O inóculo (2x) foi, posteriormente, diluído a 1:1 quando inoculado, chegando-se à concentração final desejada ( $2 \times 10^4$  a  $4 \times 10^4$  conídios/mL) (SANTOS; HAMDAN, 2005).

#### 4.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DOS DERMATÓFITOS AOS ANTIFÚNGICOS TERBINAFINA E ITRACONAZOL POR DILUIÇÃO EM MEIO SÓLIDO

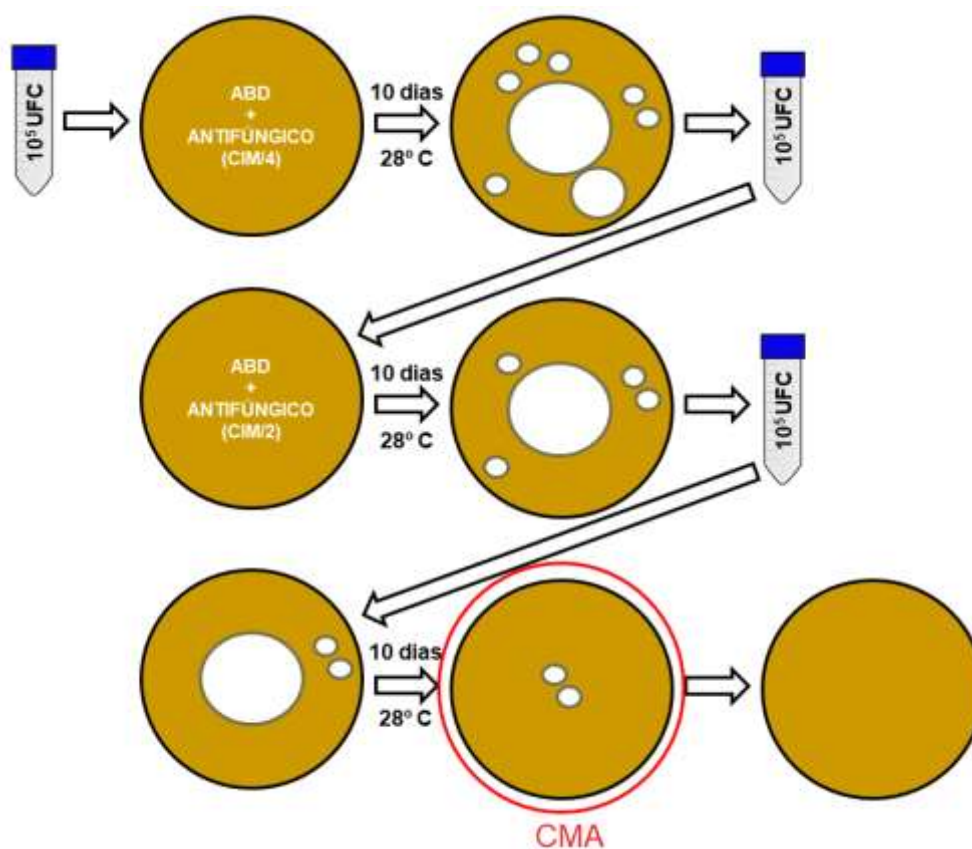
Para determinação da CIM por diluição em meio sólido, placas de Petri contendo ABD foram suplementadas com os antifúngicos itraconazol e terbinafina. Para o itraconazol, as placas foram suplementadas com o antifúngico nas seguintes concentrações: 0,06, 0,12, 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 e 4,00  $\mu\text{g/mL}$ . Para a terbinafina, as concentrações do antifúngico nas placas foram 0,003, 0,007, 0,01, 0,03, 0,06, 0,12 e 0,25  $\mu\text{g/mL}$ . As concentrações foram escolhidas com base em estudos prévios em que foi determinada a susceptibilidade de dermatófitos frente a estes dois antifúngicos (BARROS; SANTOS; HAMDAN, 2007).

Em seguida, cada placa recebeu um inóculo de  $10^5$  conídios. As placas foram incubadas por 7 dias a 28 °C e após este período foi determinada a CIM dos antifúngicos frente as diferentes linhagens. A CIM em meio sólido foi considerada como a menor concentração do antifúngico capaz de inibir 100% do crescimento fúngico (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

#### 4.5 SELEÇÃO DE LINHAGENS MENOS SUSCEPTÍVEIS AOS ANTIFÚNGICOS ITRACONAZOL E TERBINAFINA

A seleção de linhagens menos susceptíveis aos antifúngicos itraconazol e terbinafina se deu conforme esquema descrito na Figura 2.

**Figura 2.** Esquema representativo do processo de seleção de linhagens menos susceptíveis aos antifúngicos itraconazol e terbinafina. CMA = concentração máxima alcançada.



Fonte: O autor (2021)

Após a determinação da CIM em meio sólido (item 4.4), um inóculo de  $10^5$  conídios de cada linhagem foi colocado em placas de ABD previamente suplementadas com concentrações subinibitórias (CIM/4) dos antifúngicos itraconazol ou terbinafina. As placas foram incubadas por 10 dias a  $28^\circ\text{C}$ .

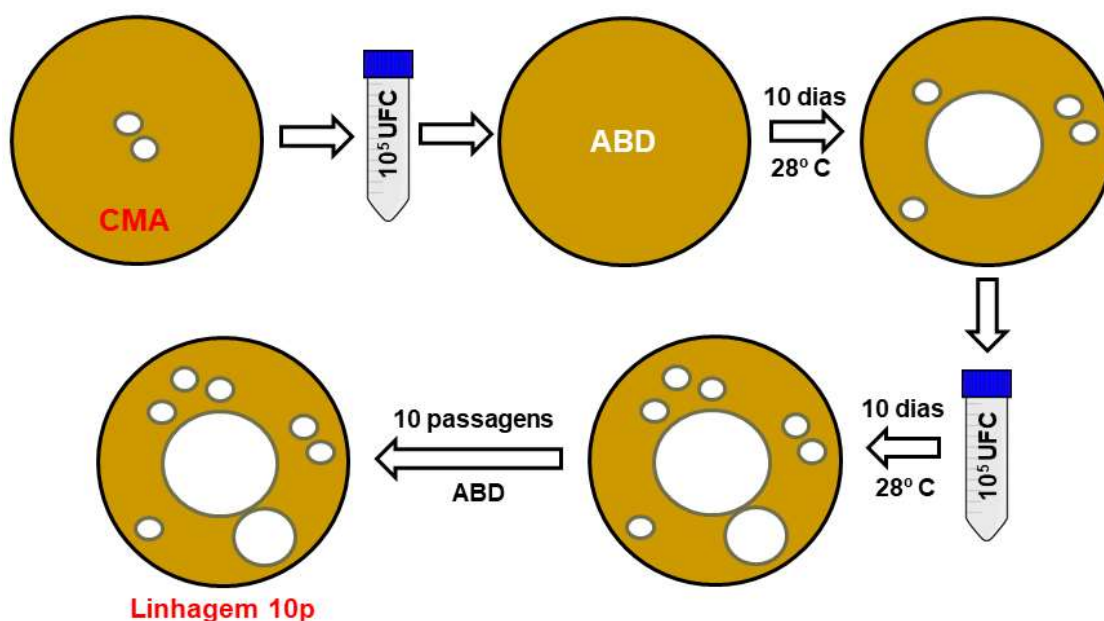
Em caso de crescimento fúngico, o inóculo foi novamente preparado. Parte do volume de inóculo preparado foi armazenada a  $-20^\circ\text{C}$  em meio CBD com 20% de glicerol e outra parte foi ajustada a concentração de  $10^5$  conídios e transferida para

uma nova placa contendo ABD suplementado com uma concentração do antifúngico 2x maior que a anterior. Este processo ocorreu de forma contínua até alcançar uma concentração de cada antifúngico que fosse capaz de inibir totalmente o crescimento fúngico.

Após inibição total do crescimento fúngico, a concentração anterior em que houve crescimento de cada linhagem frente a cada antifúngico foi denominada como a Concentração Máxima Alcançada (CMA). Determinada a CMA, os fungos foram novamente repicados em ABD suplementados com os antifúngicos itraconazol ou terbinafina em suas respectivas CMAs. As linhagens com menor susceptibilidade aos antifúngicos receberam, em sua nomenclatura, o acréscimo das siglas AI (adaptada ao itraconazol, ou seja, menos susceptível) ou AT (adaptada a terbinafina - menos susceptível) (GHELARDI *et al.*, 2014).

Estabelecidas as CMAs para cada linhagem de fungo, as linhagens AI e AT foram novamente subcultivadas em meio ABD na ausência de qualquer antifúngico para avaliar a estabilidade do perfil de menor susceptibilidade, conforme descrito na Figura 3.

**Figura 3.** Esquema representativo do processo de análise da estabilidade da susceptibilidade das linhagens após 10 passagens em meio ABD na ausência dos antifúngicos itraconazol ou terbinafina (10p).



Fonte: O autor (2021)

Para tanto, as linhagens foram repicadas por 100 dias, havendo troca de meio de cultura a cada 10 dias. Ao final, essas linhagens receberam, em sua nomenclatura, o acréscimo das siglas 10pl (menos susceptíveis ao itraconazol e após 10 passagens em meio ABD) e 10pT (menos susceptíveis a terbinafina e após 10 passagens em meio ABD) (FERREIRA *et al.*, 2015).

#### 4.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DAS LINHAGENS MENOS SUSCEPTÍVEIS AOS ANTIFÚNGICOS TERBINAFINA E ITRACONAZOL POR DILUIÇÃO EM MEIO SÓLIDO

Placas de Petri contendo ABD foram suplementadas com concentrações dos antifúngicos que variaram de 0,06 a 4,00 µg/mL e 0,007 a 0,50 µg/mL, para o itraconazol e terbinafina, respectivamente.

As linhagens AI e AT foram novamente crescidas em ABD suplementado com os antifúngicos nas CMAs previamente estabelecidas, e incubadas a 28 °C por 7 dias. Após este período, o inóculo fúngico foi preparado e 10<sup>5</sup> conídios de cada linhagem foram dispensados nas placas para determinação da CIM das linhagens AI e AT por meio do método de diluição em meio sólido. A CIM foi determinada levando-se em consideração a menor concentração do antifúngico capaz de inibir 100% do crescimento fúngico (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

#### 4.7 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DOS DERMATÓFITOS AOS ANTIFÚNGICOS TERBINAFINA E ITRACONAZOL POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO

A avaliação da sensibilidade dos dermatófitos frente à terbinafina e ao itraconazol foi realizada do método de microdiluição em caldo segundo o documento M38-A2 proposto pelo CLSI (CLSI, 2012), com modificações.

Inicialmente, foram preparadas soluções-estoque de cada antifúngico na concentração de 2000 µg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO) (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA). Posteriormente, as soluções-estoque dos antifúngicos foram diluídas em meio RPMI 1640. Por meio de diluições seriadas, foram obtidas concentrações que variaram de 0,03 a 16 µg/mL para o itraconazol e 0,001 a 1 µg/mL para a terbinafina. Na sequência, alíquotas de 100 µL de cada diluição foram distribuídas nos orifícios da placa de microdiluição de 96 poços.



Em seguida, o inóculo foi preparado e ajustado (SANTOS; HAMDAN, 2005). O teste de susceptibilidade foi realizado em placas com 96 poços de fundo chato esterilizadas. Um volume de 100 µL de cada diluição seriada foi dispensado nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, foram adicionados 100 µL do inóculo das linhagens não expostas, menos susceptíveis aos antifúngicos e após 10 passagens em meio ABD, resultando em um volume final de 200 µL/poço.

Cada placa continha um controle positivo, em que havia apenas o inóculo na ausência do antifúngico e um controle negativo, onde foi dispensado apenas o meio RPMI 1640, sem inóculo e antifúngico. Posteriormente, as placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias (CLSI, 2012).

A leitura foi realizada pela observação visual da inibição de crescimento em cada poço, comparada com o crescimento observado no poço do controle positivo. Para o itraconazol, a CIM foi considerada como a menor concentração capaz de inibir 80% do crescimento fúngico. Já para a terbinafina, a CIM foi a menor concentração capaz de inibir 100% de crescimento (CLSI, 2012). O experimento foi realizado em duplicata técnica e biológica.

#### 4.8 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS NÃO EXPOSTAS, MENOS SUSCEPTÍVEIS AO ITRACONAZOL E A TERBINAFINA E APÓS 10 PASSAGENS EM MEIO ABD

Devido aos resultados de CIM em meio RPMI 1640, optou-se por dar continuidade aos ensaios utilizando apenas as linhagens II, 865 e 917, com seus respectivos clones menos susceptíveis ao itraconazol (AI) e após dez passagens em meio ABD pós-exposição ao itraconazol (10µl). Previamente a cada ensaio, as linhagens, mantidas em Castellani (CASTELLANI, 1939) a -20 °C, foram repicadas em ABD ou ABD suplementado com itraconazol na CMA da linhagem e incubadas a 28 °C por 10 dias.

##### 4.8.1 Crescimento em meio sólido

O crescimento radial foi mensurado em placas de Petri 90 × 15 mm contendo meio ABD na ausência e na presença de itraconazol em suas respectivas CMAs. Para tanto, 10 µL de cada inóculo previamente preparado e ajustado ( $10^5$

conídios/mL) foi colocado no centro das placas. Além disso, discos de 8 mm contendo micélio das diferentes linhagens foram colocados nos centros das placas. Em seguida, as placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias. O diâmetro da colônia foi mensurado com auxílio de uma régua milimetrada após 7 dias de incubação, selecionando sempre o maior diâmetro possível (ACHTERMAN *et al.*, 2011). A velocidade média de crescimento e a porcentagem de crescimento em relação ao controle (fungo crescido na ausência de itraconazol) das diferentes linhagens foram determinados. Para determinação da velocidade média, utilizou-se a razão do crescimento radial sobre o número de dias de crescimento fúngico (mm/dia).

#### **4.8.2 Germinação de conídios**

A partir do inóculo das diferentes linhagens previamente preparados e ajustados ( $10^6$  conídios/mL), 10  $\mu$ L da suspensão de inóculo foi colocada em 990  $\mu$ L de CSD, homogeneizada em vórtex por 15 segundos e incubada a 28 °C por 24 horas. De forma similar, o ensaio foi realizado em CSD suplementado com itraconazol em concentrações subinibitórias ( $\frac{1}{2}$  CIM) para as diferentes linhagens. Após o período de 24 horas, alíquotas de cada linhagem foram tomadas e o número de conídios germinados e não germinados foi determinado utilizando um hemocitômetro. O percentual de conídios germinados foi calculado para cada grupo experimental com base no número de conídios germinados em 100 conídios contados em hemocitômetro (LIU *et al.*, 2007).

#### **4.8.3 Conidiação**

A produção de conídios das linhagens II, IIAI e II10pl foi avaliada. A opção por avaliar somente estas linhagens se deu com base nos resultados observados para a velocidade de crescimento na ausência e presença do itraconazol. Para tanto,  $10^5$  conídios foram dispensados em placas contendo meio ABD e incubados a 28 °C por 7 dias. Após este período, a cultura fúngica foi recoberta com 3mL de PBS, fragmentada por uma alça e o número de conídios na suspensão foi quantificado por meio de um hemocitômetro (ACHTERMAN *et al.*, 2011).

#### 4.8.4 Tolerância a xenobióticos

Para avaliar a tolerância das diferentes linhagens frente a diferentes antifúngicos e fontes de estresse de membrana, osmótico e oxidativo, placas de Petri contendo ABD foram suplementadas com diferentes xenobióticos. Foram utilizados os estressores de membrana celular: dodecil sulfato de sódio (SDS, 0,001%), terbinafina (0,001 µg/mL), cloreto de sódio (NaCl, 0,1 M), itraconazol (0,25 µg/mL), anfotericina B (0,12 µg/mL), amorolfina (0,12 µg/mL), ciclopirox olamina (1,00 µg/mL) e cetoconazol (0,50 µg/mL). Os estressores de parede celular utilizados foram vermelho congo (Congo, 50 µg/mL), calcoflúor (CCF, 5,00 µg/mL) e caspofungina (CAS, 0,03 µg/mL). Além disso, o estabilizante osmótico sorbitol (0,8 M) também foi utilizado. Para avaliar o estresse oxidativo, foi empregado o peróxido de hidrogênio (HP, 0,01 mM).

Em seguida, inóculo das diferentes linhagens foram preparados e ajustados na concentração de  $10^6$  conídios/mL. A partir desta suspensão, diluições seriadas (na base de 10 vezes) foram preparadas em PBS estéril. Cada placa recebeu 10 µL de conídios de cada linhagem nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  conídios/mL. Além disso, discos de 8 mm contendo micélio das diferentes linhagens foram colocados nos centros das placas. Em seguida, as placas foram incubadas a 28 °C por 72 horas. Após incubação, as placas foram fotografadas (FERNANDES *et al.*, 2016).

Para o crescimento micelial, foi determinado o percentual de crescimento de cada linhagem nos diferentes estressores e antifúngicos quando comparado a seu crescimento em meio ABD. O crescimento micelial em meio suplementado com CCF foi determinado apenas para as linhagens II, IIAI e II 10pl. A opção por avaliar somente estas linhagens se deu com base nos resultados observados para a velocidade de crescimento na ausência e presença do itraconazol.

#### 4.8.5 Quantificação de biomassa do biofilme

Linhagens não expostas, menos susceptíveis aos antifúngicos e após 10 passagens em meio ABD foram crescidas em meio ABD em suas respectivas condições e incubadas a 28 °C por 7 dias. O inóculo foi preparado e ajustado a uma concentração final de  $1 \times 10^6$  conídios/mL em hemocítmetro. Em seguida, cada um

dos poços de uma placa de 96 poços recebeu  $10^5$  conídios diluídos em meio RPMI 1640.

As placas foram incubadas sem agitação a 37 °C por 3 dias. Após a formação do biofilme, o meio de cultura foi removido e o conteúdo do poço cuidadosamente lavado com PBS 1x por três vezes. Após secagem à temperatura ambiente, 100 µL de solução de cristal violeta (0,5%) foram adicionados aos poços da placa e deixados por 5 minutos. Os poços foram lavados com água destilada estéril para remover o excesso do corante. A massa do biofilme foi descorada por meio da adição de 100 µL de solução de etanol a 95% em cada poço. A solução de etanol foi suavemente homogeneizada com uma pipeta Pasteur.

A solução de cada poço foi transferida para uma nova placa para leitura em espectrofotômetro (Multiskan Spectrum, v 1.2, Thermo Scientific) a um comprimento de onda de 570 nm. A absorbância está diretamente relacionada à quantidade de biomassa do biofilme formado pelas diferentes linhagens (COSTA-ORLANDI *et al.*, 2014).

#### **4.8.6 Quantificação de matriz extracelular do biofilme**

O biofilme foi formado em placas de 96 poços (item 4.8.5) e a matriz extracelular foi corada com 50 µl de solução de safranina por cinco minutos. Após esse período, os poços foram lavados com água destilada estéril e as placas lidas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 492 nm (Multiskan Spectrum, v 1.2, Thermo Fisher Scientific). A absorbância está diretamente relacionada ao conteúdo de matriz extracelular formada pelas diferentes linhagens (SEIDLER; SALVENMOSER; MULLER, 2008).

#### **4.8.7 Quantificação de atividade metabólica do biofilme**

A atividade metabólica do biofilme formado por II, IIAI e II 10pl foi quantificada (BITENCOURT *et al.*, 2021). Um inóculo de  $10^5$  conídios previamente ajustado em RPMI 1640 de cada linhagem foi colocado em placas de 96 poços e as placas foram incubadas a 37 °C sem agitação por 24, 72 e 120 horas. A atividade metabólica dos biofilmes foi determinado usando o ensaio de redução de XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida). Ao final de cada período de

incubação, 50 µL de solução XTT (1 mg/mL) junto a 4 µL de solução de menadiona (1 mM) foi adicionado a cada poço seguido de incubação a 37 °C durante 3 horas. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para uma nova placa e a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro (Multiskan Spectrum, v 1.2, Thermo Fisher Scientific) a um comprimento de onda de 450 nm. A mudança colorimétrica em biofilmes fúngicos se correlaciona com a viabilidade celular.

#### **4.8.8 Quantificação de ergosterol**

Vinte miligramas de massa fúngica de cada linhagem foi coletada, armazenada em tubos onde foram adicionados 3 mL de solução etanólica de hidróxido de potássio (25%), seguido por 1 minuto de agitação em vórtex. Posteriormente, os tubos foram incubados em banho-maria a 85 °C por 1 hora e resfriados à temperatura ambiente.

Os esteróis foram extraídos por meio da adição de 3 mL de n-heptano (Sigma-Aldrich) e 1 mL de água destilada esterilizada seguida de agitação vigorosa em vórtex por 3 minutos. O sobrenadante foi coletado, armazenado em placas de 96 poços que foram lidas em espectrofotômetro (Multiskan Spectrum, v 1.2, Thermo Fisher Scientific) a 282 e 230 nm junto a uma curva padrão de ergosterol (Sigma-Aldrich). A absorbância foi posteriormente convertida em conteúdo de ergosterol com base na curva padrão (ARTHINGTON-SKAGGS *et al.*, 2000). Além disso, foi determinado o conteúdo de ergosterol constitutivo por meio de uma razão entre o conteúdo de ergosterol da linhagem AI ou 10pl sob o conteúdo da linhagem não exposta ao antifúngico. A linhagem II crescida em ABD suplementado com peróxido de hidrogênio (HP; 0,01 mM) foi utilizada como controle.

#### **4.8.9 Peroxidação lipídica**

Os produtos da peroxidação lipídica foram mensurados por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O centrifugado foi congelado e homogeneizado em 1mL de ácido fosfórico 1,1% congelado. O homogenato (0,4mL) foi homogeneizado com 0,4mL de uma solução contendo 1% de ácido tiobarbitúrico (Sigma–Aldrich), 50mM de NaOH e 0,1mM de butilhidroxitolueno (BHT) e com 0,2mL de uma solução com 7% de ácido fosfórico (todas as soluções foram mantidas

geladas durante a manipulação). Em seguida, as amostras (pH 1,5) foram aquecidas por 15 minutos a 98°C. Após resfriamento em gelo adicionou-se 1,5mL de butanol. O homogenato foi agitado vigorosamente e centrifugado por 5 minutos em 2000 g. A fase orgânica foi adicionada em cubetas de vidro e mensuradas as absorvâncias a 532nm (Multiskan Spectrum, v 1.2, Thermo Fisher Scientific). A solução de ácido tiobarbitúrico foi trocada por uma solução de HCl a 3mM para o branco (FERREIRA *et al.*, 2013). Os valores de TBARS foram expressos usando o coeficiente de extinção molar de 156 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. A linhagem II crescida em ABD suplementado com peróxido de hidrogênio (HP; 0,01 mM) foi utilizada como controle positivo de peroxidação.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *MDR2*, *MDR3*, *ERG11* E *RPB2*

##### 4.9.1 Extração do RNA

As linhagens II, IIAI e II 10pl (10<sup>4</sup> conídios) foram cultivadas por 72 horas em 100mL de CSD sob agitação (100 rpm) a 28 °C. Além disso, um grupo com as linhagens II, IIAI e II 10pl expostas a ITR em concentração subinibitória (0,12 µg/mL para II e 0,50 µg/mL para IIAI e II 10pl) por 30 minutos foi incluído. Após este período, o conteúdo foi filtrado e a massa fúngica seca armazenada a -80 °C. A amostra das diferentes linhagens (100 mg) foi macerada em cadinhos de porcelana com auxílio de nitrogênio líquido a fim de facilitar o rompimento da parede celular. O RNA foi extraído por meio do reagente TRIzol<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific) conforme as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi quantificada em Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) e ajustada para 1000 µg/mL. Em seguida, o RNA foi tratado com DNase por 30 minutos a 37 °C, e a enzima foi inativada com a adição 1 µl de 50mM EDTA e incubada a 65 °C por 10 minutos.

##### 4.9.2 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit M-MLV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA resultante foi diluído em 50 µl de água ultra

pura livre de RNase e utilizado como molde nas reações de PCR em tempo real (qPCR).

#### 4.9.3 qPCR

Foi avaliada a expressão dos genes *MDR2*, *MDR3* e *ERG11*. O gene de referência *RPB2* foi utilizado como controle endógeno para normalização dos dados (JACOB *et al.*, 2012). Os *primers* utilizados e suas respectivas sequências de oligonucleotídeos e referências de onde foram retiradas estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Relação, sequências e referências dos *primers* utilizados para qPCR.

|  | <i>Primer</i> | <i>Forward</i>              | <i>Reverse</i>                | Referência                  |
|--|---------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Gene de controle endógeno                  | <i>RPB2</i>   | TGCAGGAGCTGG<br>TGGAAGA     | GCTGGGAGGTA<br>CTGTTGATCAA    | Jacob <i>et al.</i> (2012)  |
| Bombas de efluxo MDR                       | <i>MDR2</i>   | TGACTCTGAATC<br>CGA         | GTCGGTGAGCAAC<br>AG           | Fachin <i>et al.</i> (2006) |
|  | <i>MDR3</i>   | GATGCATCCTGC<br>AAAGTACG    | AGGCTCCTTGGTG<br>CTTGAC       | Monod <i>et al.</i> (2019)  |
| Enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase | <i>ERG11</i>  | CACTTCCTTGCC<br>CTGTAGAGATC | GGAGTTTTCAATGT<br>CAGCAAGGTTT | Komoto <i>et al.</i> (2015) |

A quantificação foi realizada usando o sistema QuantiStudio1 (Thermo Fisher Scientific), e as reações foram preparadas com SYBR Green e PCR Master Mix (Life Technologies, Waltham, MA, EUA). ROX foi utilizado como normalizador para o sinal de fluorescência. O método de quantificação relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) foi utilizado para calcular alterações na expressão gênica (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Todas as reações foram realizadas em duplicata técnica e biológica.

#### 4.10 QUESTÕES ÉTICAS

O protocolo de experimentação animal foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) sob o protocolo 228/2019 (Anexo 1).

Na experimentação foram utilizados camundongos convencionais fêmeas de 6 a 8 semanas de idade da linhagem BALB/c. Os animais tiveram acesso a ração sólida e água *ad libitum*.

Para os experimentos, os camundongos foram mantidos em gaiolas modelo ALE. MIL.01.03 (Alesco), no biotério do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG. Um ciclo diurno/noturno de 12 h foi mantido no biotério, assim como aeração e temperatura controladas. A manutenção, assim como o uso dos animais nos experimentos foi conduzida respeitando as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (2006).

#### 4.11 INTERAÇÃO DAS LINHAGENS NÃO EXPOSTAS, MENOS SUSCEPTÍVEIS AO ITRACONAZOL E A TERBINAFINA E APÓS 10 PASSAGENS EM MEIO ABD COM MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA (BMDM)

##### **4.11.1 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) e desafio com linhagens não expostas, menos susceptíveis aos antifúngicos e após 10 passagens em meio ABD**

As células precursoras de macrófagos foram obtidas da medula óssea de camundongos BALB/c. Os animais foram anestesiados e eutanasiados e os fêmures e tíbias cuidadosamente extraídos e adicionados a um tubo de 15mL de polipropileno contendo PBS 1x estéril e, posteriormente, deixados em etanol 70% por 1 minuto. Utilizando-se meio RPMI 1640 e uma seringa com agulha 0,70 x 25 mm, as células foram removidas e transferidas para um tubo de polipropileno estéril.

Para a diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SFB, 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica e também com 30% de sobrenadante de cultura de células L-929. O sobrenadante de células L-929 contém quantidade significativa de Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos (M-CSF, do inglês *Macrophage-Colony Stimulating Factor*) que é um fator de crescimento essencial para a diferenciação de células progenitoras em macrófagos.

A suspensão de células foi colocada em placas de Petri e incubada em estufas com 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C por 7 dias, sendo o meio renovado a cada 48 horas. Ao



sétimo dia em cultura, o sobrenadante foi descartado e a cultura de células na placa lavada com 5 mL de PBS 1x estéril para eliminar as células não aderentes. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de PBS/EDTA 10 mM à cultura na placa, seguido de incubação em gelo por 10 minutos.

As células aderidas à placa, já diferenciadas em macrófagos, foram ressuspensas e transferidas para um tubo de polipropileno estéril. Os BMDM foram centrifugados a 200 x g por 5 minutos a 4 °C e ressuspensos em 5 mL de meio RPMI 1640 contendo 10% SFB, 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica e 5% de sobrenadante de cultura de células L929. As células viáveis foram contadas em hemocitômetro usando azul de Trypan, plaqueadas em placas de cultura de 24 e 96 poços de acordo com os objetivos propostos, seguido de incubação em estufa a 37 °C e atmosfera a 5% CO<sub>2</sub>. Após vinte e quatro horas, as células foram utilizadas para os ensaios (WEISCHENFELDT; PORSE, 2008).

Para desafiar os macrófagos no ensaio de fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxinitrito (PRN), atividade fungicida, exocitose e produção de óxido nítrico (NO) foram preparadas culturas de conídios das linhagens não expostas, menos susceptíveis aos antifúngicos e após 10 passagens em meio ABD em suas respectivas condições e incubadas a 28 °C por 7 dias. O inóculo fúngico foi ajustado para a concentração de 1 x 10<sup>6</sup> conídios/mL e adicionado à cultura de macrófagos na concentração de 2 x 10<sup>5</sup> células/mL (proporção 5:1 de conídios para macrófagos).

#### **4.11.2 Ensaio de fagocitose**

O ensaio de fagocitose foi realizado em placas de 24 poços com lamínulas circulares (13 mm de diâmetro) previamente colocadas nas bases dos poços (PERFECT *et al.*, 2010).

Após a infecção dos macrófagos, nos tempos de 2 e 6 horas, o sobrenadante da cultura foi removido e as células aderidas às lamínulas coradas com corante Panótico Rápido (Laborclin, Paraná, Brasil), conforme sugerido pelo fabricante, para visualização da fagocitose e determinação do índice fagocítico (RIBEIRO *et al.*, 2017). O índice fagocítico foi calculado com base no número de conídios internalizados a cada 100 macrófagos contabilizados (conídios/100Φ).

#### **4.11.3 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxinitrito (PRN) pelos macrófagos**

A quantidade endógena de ROS e PRN foi mensurada por um ensaio fluorimétrico utilizando uma sonda específica (SOARES *et al.*, 2011). No tempo de 2 e 6 horas pós-desafio, a suspensão de macrófagos e conídios foi incubada 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 ROS e PRN, respectivamente. A fluorescência foi mensurada em fluorímetro (Synergy 2 SL Luminescence Microplate Reader; Biotek), utilizando comprimentos de onda de excitação e de emissão de 500 nm (SANTOS *et al.*, 2014). Os dados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (UA) sob o número de fungos recuperados (UFC) do interior dos macrófagos lisados nos tempos de 2 e 6 horas (UA/UFC).

#### **4.11.4 Quantificação da produção de óxido nítrico (NO)**

A quantificação de óxido nítrico (NO) foi realizada segundo a metodologia de Griess (FRIEDMAN *et al.*, 2008). A detecção usando o reagente de Griess foi usada para determinar os níveis residuais de nitrito no sobrenadante das culturas coletado no tempo de 2 e 6 horas pós-desafio. A adição de ácido sulfanílico e N-(1-naftil)-etilenodiamina ao sobrenadante gera um produto de coloração mensurada em espectrofotômetro (Multiskan Spectrum, v 1.2, Thermo Fisher Scientific) no comprimento de onda de 548 nm. A leitura da absorbância foi realizada junto a uma curva padrão de nitrito. A absorbância foi posteriormente convertida em conteúdo de óxido nítrico com base na curva padrão.

#### **4.11.5 Atividade fungicida e taxa de proliferação intracelular (IPR)**

Para investigar a capacidade dos macrófagos em controlar a proliferação fúngica após fagocitose, avaliou-se a atividade fungicida dos macrófagos (MA *et al.*, 2009). Para tanto, o ensaio de atividade fungicida foi realizado em placas de 24 poços e conídios não internalizados pelos macrófagos presentes no sobrenadante

foram removidos a partir da lavagem dos poços nos tempos de 2 e 6 horas pós-desafio com 500 µL de PBS 1x, por 2 vezes. Em seguida, os macrófagos foram lisados com 200 µL de água esterilizada e incubados por 30 minutos a 37 °C. Após o período de incubação, o lisado foi coletado e plaqueado em ABD a 28 °C por 3 dias para a contagem e determinação de UFC/mL. Esse valor foi utilizado para determinação de unidades arbitrárias de fluorescência (UA) sob o número de fungos recuperados (UFC) do interior dos macrófagos (UA/UFC).

Além disso, foi determinada a taxa de proliferação intracelular (IPR) para cada linhagem. Para tanto, realizou-se a razão do número de fungos recuperados do interior do macrófago no tempo de 6 horas sob o tempo de 2 horas (RIBEIRO *et al.*, 2017).

#### **4.11.6 Exocitose**

Para avaliar a capacidade de exocitose dos conídios das diferentes linhagens de dermatófitos testadas foi realizado um ensaio de exocitose. Para tanto, 3 horas pós-desafio, a cultura foi lavada com 500 µL de PBS 1x, por 2 vezes, para total remoção dos conídios presentes no sobrenadante e 500 µL de um novo meio de cultura foi colocado em cada poço. A placa foi novamente incubada em estufa a 37 °C e atmosfera a 5% CO<sub>2</sub>. Após 3 horas, o sobrenadante foi plaqueado em meio ABD e as placas foram incubadas a 28 °C por 3 dias para determinação de UFC/mL.

### **4.12 INTERAÇÃO DAS LINHAGENS NÃO EXPOSTAS, MENOS SUSCEPTÍVEIS AO ITRACONAZOL E A TERBINAFINA E APÓS 10 PASSAGENS EM MODELO MURINO DE DERMATOFITOSE**

#### **4.12.2 Grupos experimentais**

Para o experimento em modelo murino, estabeleceram-se nove grupos: animais infectados com a (i) linhagem II, (ii) linhagem IIAI, (iii) linhagem II10pl, (iv) linhagem 865, (v) linhagem 865AI, (vi) linhagem 86510pl, (vii) linhagem 917, (viii) linhagem 917AI e (iv) linhagem 91710pl. Cada grupo tinha um total de seis animais.

#### 4.12.2 Tricotomia, infecção e recuperação de carga fúngica da pele

Uma área de 2 × 2 cm<sup>2</sup> das costas dos camundongos foi raspada e marcada com um bisturi estéril. Conídios (10<sup>6</sup> células/animal) foram inoculados nos tecidos cutâneos e subcutâneos em quatro pontos da área raspada, com um volume máximo de 100 µL por animal.

Sete dias pós-infecção, os animais foram eutanasiados após anestesia com cetamina/xilazina (100 / 10 mg/kg) e as áreas raspadas da pele foram assepticamente recolhidas e pesadas (CARMO *et al.*, 2020). A carga fúngica foi determinada por maceração da pele com 1,0 mL de PBS 1x, e 50 µL da suspensão foram plaqueados em ABD e incubados a 28 °C por 3 dias. Os resultados foram expressos como unidades formadoras de colônias por grama de pele (UFC/g).

#### 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por meio do Software *Prism 6* (*GraphPad Inc.*, San Diego, CA, USA) utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey e, para as curvas de crescimento, foi determinada a área sob a curva. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO ITRACONAZOL E TERBINAFINA PARA AS LINHAGENS NÃO EXPOSTAS, AI e AT, DETERMINADA PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM MEIO SÓLIDO

As CIMs do itraconazol e terbinafina em meio sólido para as linhagens não expostas (NE) e menos susceptíveis aos antifúngicos (AI e AT) estão sumarizadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Concentração inibitória mínima (CIM) do itraconazol (ITR) e terbinafina (TERB) para diferentes linhagens de *T. interdigitale* e *T. rubrum* não expostas (NE) e menos susceptíveis ao itraconazol (AI) e a terbinafina (AT), determinada pelo método de diluição em meio sólido. Os valores de CIM em negrito e entre parênteses indicam o aumento da CIM comparado a respectiva linhagem NE.

| Linhagem                |       | CIM (µg/mL)       |                   |       |                   |
|-------------------------|-------|-------------------|-------------------|-------|-------------------|
|                         |       | ITR               |                   | TERB  |                   |
|                         |       | NE                | AI                | NE    | AT                |
| <i>T. interdigitale</i> | 9533  | 0,500             | 0,500             | 0,007 | 0,007             |
|                         | I     | 0,500             | <b>1,000 (2x)</b> | 0,003 | <b>0,007 (2x)</b> |
|                         | II    | 0,500             | <b>1,000 (2x)</b> | 0,003 | <b>0,014 (4x)</b> |
|                         | III   | 0,500             | <b>1,000 (2x)</b> | 0,007 | 0,007             |
|                         | IV    | 0,250             | <b>1,000 (4x)</b> | 0,003 | 0,003             |
|                         | 312   | 0,500             | <b>1,000 (2x)</b> | 0,003 | 0,003             |
|                         | 716   | 0,250             | <b>0,500 (2x)</b> | 0,007 | 0,007             |
|                         | 786   | 0,500             | <b>1,000 (2x)</b> | 0,007 | <b>0,014 (2x)</b> |
|                         | 855   | 0,250             | <b>0,500 (2x)</b> | 0,003 | 0,003             |
|                         | 865   | 0,500             | <b>2,000 (4x)</b> | 0,003 | <b>0,007 (2x)</b> |
| 917                     | 0,500 | <b>1,000 (2x)</b> | 0,007             | 0,007 |                   |
| <i>T. rubrum</i>        | 28189 | 0,500             | 0,500             | 0,003 | 0,003             |
|                         | 320   | 0,500             | 0,500             | 0,003 | <b>0,007 (2x)</b> |
|                         | III   | 0,500             | <b>1,000 (2x)</b> | 0,007 | 0,007             |
|                         | 855   | 0,500             | 0,500             | 0,003 | 0,003             |
|                         | 916   | 0,250             | 0,500             | 0,003 | 0,003             |

As linhagens de *T. interdigitale* e *T. rubrum* não expostas aos antifúngicos apresentaram CIM entre 0,250 e 0,500 µg/mL para o itraconazol e entre 0,003 e 0,007 µg/mL para terbinafina.

Para o itraconazol, a maior parcela das linhagens (70,58%) apresentou CIM aumentada, em no mínimo duas vezes, quando comparado à CIM da linhagem não exposta. Para as linhagens AI, a CIM variou entre 0,500 e 2,000 µg/mL. Já para as linhagens AT, a CIM variou entre 0,003 e 0,01 µg/mL, de forma que 29,41% das linhagens apresentaram CIM maiores quando comparado a CIM das respectivas linhagens não expostas (Tabela 2).

A concentração máxima alcançada (CMA) das linhagens NE, AI e AT também foi determinada (Tabela 3).

**Tabela 3.** Concentração máxima alcançada (CMA) do itraconazol (ITR) e terbinafina (TERB) para diferentes linhagens de *T. interdigitale* e *T. rubrum* não expostas (NE) e menos susceptíveis ao itraconazol (AI) e a terbinafina (AT), determinada pelo método de diluição em meio sólido.

| Linhagem                |       | CMA (µg/mL) |       |       |       |
|-------------------------|-------|-------------|-------|-------|-------|
|                         |       | ITR         |       | TERB  |       |
|                         |       | NE          | AI    | NE    | AT    |
| <i>T. interdigitale</i> | 9533  | 0,250       | 0,250 | 0,003 | 0,003 |
|                         | I     | 0,250       | 0,500 | 0,001 | 0,003 |
|                         | II    | 0,250       | 0,500 | 0,001 | 0,007 |
|                         | III   | 0,250       | 0,500 | 0,003 | 0,003 |
|                         | IV    | 0,125       | 0,500 | 0,001 | 0,001 |
|                         | 312   | 0,250       | 0,500 | 0,001 | 0,001 |
|                         | 716   | 0,125       | 0,250 | 0,003 | 0,003 |
|                         | 786   | 0,250       | 0,500 | 0,003 | 0,007 |
|                         | 855   | 0,125       | 0,250 | 0,001 | 0,001 |
|                         | 865   | 0,250       | 1,000 | 0,001 | 0,003 |
| 917                     | 0,250 | 0,500       | 0,003 | 0,003 |       |
| <i>T. rubrum</i>        | 28189 | 0,250       | 0,250 | 0,001 | 0,001 |
|                         | 320   | 0,250       | 0,250 | 0,001 | 0,003 |
|                         | III   | 0,250       | 0,500 | 0,003 | 0,003 |
|                         | 855   | 0,250       | 0,250 | 0,001 | 0,001 |
|                         | 916   | 0,125       | 0,250 | 0,001 | 0,001 |

A CMA das linhagens de *T. interdigitale* e *T. rubrum* não expostas variou entre 0,125 e 0,250 µg/mL para itraconazol e entre 0,001 e 0,003 µg/mL para terbinafina. Para as linhagens AI e AT, a CIM variou de 0,250 e 1,000 µg/mL para itraconazol e de 0,001 e 0,007 µg/mL para terbinafina (Tabela 3).

## 5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS ANTIFÚNGICOS ITRACONAZOL, AMOROLFINA, CETOCONAZOL, CICLOPIROX OLAMINA E TERBINAFINA PARA AS LINHAGENS NÃO EXPOSTAS, AI, AT, 10pl e 10pT PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

As CIMs dos antifúngicos itraconazol, amorolfina, cetoconazol, ciclopirox olamina e terbinafina para as linhagens não expostas aos antifúngicos (NE) estão descritas nas Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8.

**Tabela 4.** Concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico itraconazol (ITR) para diferentes linhagens de *T. interdigitale* e *T. rubrum* não expostas (NE), menos susceptíveis ao itraconazol (AI) e a terbinafina (AT), e após 10 passagens em meio na ausência de itraconazol (10pl) e terbinafina (10pT) determinada pelo método de microdiluição em caldo. Os valores de CIM em negrito e entre parênteses indicam o aumento da CIM comparado a respectiva linhagem NE.

| Linhagem                |       | CIM (µg/mL)       |                   |                   |                   |                   |
|-------------------------|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                         |       | ITR               |                   |                   |                   |                   |
|                         |       | NE                | AI                | 10pl              | AT                | 10pT              |
| <i>T. interdigitale</i> | 9533  | 0,250             | 0,250             | ND                | <b>0,500 (2x)</b> | ND                |
|                         | I     | 0,250             | 0,250             | ND                | <b>0,500 (2x)</b> | ND                |
|                         | II    | 0,250             | <b>1,000 (4x)</b> | <b>1,000 (4x)</b> | <b>0,500 (2x)</b> | <b>1,000 (4x)</b> |
|                         | III   | 0,500             | 0,500             | ND                | <b>1,000 (2x)</b> | ND                |
|                         | IV    | 0,250             | 0,250             | ND                | <b>1,000 (4x)</b> | ND                |
|                         | 312   | 0,125             | <b>0,250 (2x)</b> | ND                | <b>0,500 (4x)</b> | ND                |
|                         | 716   | 0,250             | 0,250             | ND                | <b>0,500 (2x)</b> | ND                |
|                         | 786   | 0,250             | <b>0,500 (2x)</b> | ND                | <b>0,500 (4x)</b> | ND                |
|                         | 855   | 0,125             | <b>0,500 (4x)</b> | ND                | <b>0,500 (4x)</b> | ND                |
|                         | 865   | 0,250             | <b>0,500 (2x)</b> | <b>0,500 (2x)</b> | 0,250             | 0,125             |
| 917                     | 0,125 | <b>0,500 (4x)</b> | <b>0,500 (4x)</b> | 0,125             | ND                |                   |
| <i>T. rubrum</i>        | 28189 | 0,250             | 0,125             | ND                | <b>0,500 (2x)</b> | ND                |
|                         | 320   | 0,250             | 0,250             | ND                | <b>0,500 (2x)</b> | ND                |
|                         | III   | 0,125             | <b>0,250 (2x)</b> | ND                | <b>0,500 (4x)</b> | ND                |
|                         | 855   | 0,125             | 0,125             | ND                | <b>0,500 (4x)</b> | ND                |
|                         | 916   | 0,250             | 0,250             | ND                | <b>0,500 (2x)</b> | ND                |

ND: não determinado.

A CIM das diferentes linhagens de *T. interdigitale* e *T. rubrum* variou entre 0,125 e 0,500 µg/mL para o itraconazol. Para as linhagens *T. interdigitale* II AI, 312 AI, 786 AI, 855 AI, 865 AI, 917 AI e de *T. rubrum* III AI foi maior quando comparado com a linhagem não exposta. Além disso, as linhagens *T. interdigitale* II 10pl, 865 10pl e 917 10pl mantiveram o perfil de menor susceptibilidade mesmo após subcultivo na ausência do antifúngico.

Para as linhagens AT, foi observado aumento da CIM em 14 das 16 linhagens avaliadas (87,50%). Já a linhagem *T. interdigitale* II 10pT exibiu manutenção do aumento da CIM (Tabela 4).



**Tabela 5.** Concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico amorolfina (AMO) para diferentes linhagens de *T. interdigitale* e *T. rubrum* não expostas (NE), menos susceptíveis ao itraconazol (AI) e a terbinafina (AT), e após 10 passagens em meio na ausência de itraconazol (10pl) e terbinafina (10pT) determinada pelo método de microdiluição em caldo. Os valores de CIM em negrito e entre parênteses indicam o aumento da CIM comparado a respectiva linhagem NE.

| Linhagem                |       | CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) |                   |       |                   |       |
|-------------------------|-------|--------------------------|-------------------|-------|-------------------|-------|
|                         |       | AMO                      |                   |       |                   |       |
|                         |       | NE                       | AI                | 10pl  | AT                | 10pT  |
| <i>T. interdigitale</i> | 9533  | 0,250                    | 0,250             | ND    | 0,250             | ND    |
|                         | I     | 0,250                    | 0,250             | ND    | <b>0,500 (2x)</b> | ND    |
|                         | II    | 0,250                    | 0,250             | 0,250 | <b>0,500 (2x)</b> | 0,250 |
|                         | III   | 1,000                    | 1,000             | ND    | 1,000             | ND    |
|                         | IV    | 0,250                    | 0,250             | ND    | 0,250             | ND    |
|                         | 312   | 0,062                    | <b>0,250 (4x)</b> | ND    | 0,120             | ND    |
|                         | 716   | 0,250                    | 0,062             | ND    | 0,060             | ND    |
|                         | 786   | 1,000                    | 1,000             | ND    | 1,000             | ND    |
|                         | 855   | 0,125                    | <b>0,500 (4x)</b> | ND    | 0,120             | ND    |
|                         | 865   | 0,500                    | 0,500             | 0,125 | <b>1,000 (2x)</b> | 0,125 |
| 917                     | 0,125 | 0,125                    | 0,125             | 0,120 | ND                |       |
| <i>T. rubrum</i>        | 28189 | 0,125                    | 0,125             | ND    | 0,120             | ND    |
|                         | 320   | 0,250                    | 0,250             | ND    | 0,250             | ND    |
|                         | III   | 0,250                    | 0,250             | ND    | 0,250             | ND    |
|                         | 855   | 0,250                    | 0,125             | ND    | 0,120             | ND    |
|                         | 916   | 0,250                    | 0,250             | ND    | 0,250             | ND    |

ND: não determinado.

A CIM de amorolfina variou entre 0,062 e 1,000  $\mu\text{g/mL}$  para as linhagens NE. Houve aumento da CIM para *T. interdigitale* 312 AI, 855 AI, I AT, II AT e 865 AT (Tabela 5).

**Tabela 6.** Concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico cetoconazol (CTZ) para diferentes linhagens de *T. interdigitale* e *T. rubrum* não expostas (NE), menos susceptíveis ao itraconazol (AI) e a terbinafina (AT), e após 10 passagens em meio na ausência de itraconazol (10pl) e terbinafina (10pT) determinada pelo método de microdiluição em caldo. Os valores de CIM em negrito e entre parênteses indicam o aumento da CIM comparado a respectiva linhagem NE.

| Linhagem                |       | CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) |                   |       |       |       |
|-------------------------|-------|--------------------------|-------------------|-------|-------|-------|
|                         |       | CTZ                      |                   |       |       |       |
|                         |       | NE                       | AI                | 10pl  | AT    | 10pT  |
| <i>T. interdigitale</i> | 9533  | 0,500                    | 0,500             | ND    | 0,500 | ND    |
|                         | I     | 0,500                    | 0,500             | ND    | 0,500 | ND    |
|                         | II    | 0,500                    | 0,500             | 0,500 | 0,500 | 0,500 |
|                         | III   | 1,000                    | 1,000             | ND    | 1,000 | ND    |
|                         | IV    | 1,000                    | 1,000             | ND    | 1,000 | ND    |
|                         | 312   | 0,500                    | 0,500             | ND    | 0,500 | ND    |
|                         | 716   | 0,500                    | 0,500             | ND    | 0,500 | ND    |
|                         | 786   | 1,000                    | 1,000             | ND    | 1,000 | ND    |
|                         | 855   | 0,500                    | 0,500             | ND    | 0,500 | ND    |
|                         | 865   | 0,500                    | <b>1,000 (2x)</b> | 0,500 | 0,500 | 0,500 |
| 917                     | 0,500 | <b>1,000 (2x)</b>        | 0,500             | 0,500 | ND    |       |
| <i>T. rubrum</i>        | 28189 | 0,500                    | 0,500             | ND    | 0,500 | ND    |
|                         | 320   | 0,500                    | 0,500             | ND    | 0,500 | ND    |
|                         | III   | 0,500                    | 0,500             | ND    | 0,500 | ND    |
|                         | 855   | 0,500                    | 0,500             | ND    | 0,500 | ND    |
|                         | 916   | 0,500                    | 0,500             | ND    | 0,500 | ND    |

ND: não determinado.

A CIM de *T. interdigitale* e *T. rubrum* variou entre 0,500 e 1,000  $\mu\text{g/mL}$  para o cetoconazol. As linhagens *T. interdigitale* 865 AI e 917 AI exibiram aumento da CIM quando comparado com a linhagem não exposta (Tabela 6).

**Tabela 7.** Concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico ciclopirox olamina (CIC) para diferentes linhagens de *T. interdigitale* e *T. rubrum* não expostas (NE), menos susceptíveis ao itraconazol (AI) e a terbinafina (AT), e após 10 passagens em meio na ausência de itraconazol (10pl) e terbinafina (10pT) determinada pelo método de microdiluição em caldo. Os valores de CIM em negrito e entre parênteses indicam o aumento da CIM comparado a respectiva linhagem NE.

| Linhagem                |       | CIM (µg/mL)       |                   |       |                  |       |
|-------------------------|-------|-------------------|-------------------|-------|------------------|-------|
|                         |       | CIC               |                   |       |                  |       |
|                         |       | NE                | AI                | 10pl  | AT               | 10pT  |
| <i>T. interdigitale</i> | 9533  | 2,000             | 2,000             | ND    | 2,000            | ND    |
|                         | I     | 2,000             | 2,000             | ND    | 2,000            | ND    |
|                         | II    | 2,000             | 2,000             | 2,000 | <b>4,00 (2x)</b> | 2,000 |
|                         | III   | 4,000             | 4,000             | ND    | 4,000            | ND    |
|                         | IV    | 2,000             | 2,000             | ND    | 2,000            | ND    |
|                         | 312   | 1,000             | 1,000             | ND    | 1,000            | ND    |
|                         | 716   | 2,000             | 2,000             | ND    | 2,000            | ND    |
|                         | 786   | 2,000             | 2,000             | ND    | 2,000            | ND    |
|                         | 855   | 1,000             | <b>2,000 (2x)</b> | ND    | 1,000            | ND    |
|                         | 865   | 2,000             | 2,000             | 2,000 | 2,000            | 2,000 |
| 917                     | 2,000 | <b>4,000 (2x)</b> | 2,000             | 2,000 | ND               |       |
| <i>T. rubrum</i>        | 28189 | 1,000             | 1,000             | ND    | 1,000            | ND    |
|                         | 320   | 2,000             | 2,000             | ND    | 2,000            | ND    |
|                         | III   | 2,000             | 2,000             | ND    | 2,000            | ND    |
|                         | 855   | 2,000             | 2,000             | ND    | 2,000            | ND    |
|                         | 916   | 1,000             | 1,000             | ND    | 1,000            | ND    |

ND: não determinado.

A CIM de ciclopirox olamina para *T. interdigitale* e *T. rubrum* variou de 1,000 a 4,000 µg/mL. Houve aumento da CIM também para *T. interdigitale* 855 AI, 917 AI e II AT (Tabela 7).

**Tabela 8.** Concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico terbinafina (TERB) para diferentes linhagens de *T. interdigitale* e *T. rubrum* não expostas (NE), menos susceptíveis ao itraconazol (AI) e a terbinafina (AT), e após 10 passagens em meio na ausência de itraconazol (10pI) e terbinafina (10pT) determinada pelo método de microdiluição em caldo. Os valores de CIM em negrito e entre parênteses indicam o aumento da CIM comparado a respectiva linhagem NE.

| Linhagem                |       | CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) |       |       |                   |       |
|-------------------------|-------|--------------------------|-------|-------|-------------------|-------|
|                         |       | TERB                     |       |       |                   |       |
|                         |       | NE                       | AI    | 10pI  | AT                | 10pT  |
| <i>T. interdigitale</i> | 9533  | 0,010                    | 0,010 | ND    | 0,010             | ND    |
|                         | I     | 0,030                    | 0,030 | ND    | <b>0,060 (2x)</b> | ND    |
|                         | II    | 0,030                    | 0,030 | 0,030 | <b>0,060 (2x)</b> | 0,030 |
|                         | III   | 0,120                    | 0,120 | ND    | 0,120             | ND    |
|                         | IV    | 0,030                    | 0,030 | ND    | 0,030             | ND    |
|                         | 312   | 0,010                    | 0,010 | ND    | 0,010             | ND    |
|                         | 716   | 0,003                    | 0,003 | ND    | 0,003             | ND    |
|                         | 786   | 0,060                    | 0,060 | ND    | 0,060             | ND    |
|                         | 855   | 0,060                    | 0,060 | ND    | 0,060             | ND    |
|                         | 865   | 0,060                    | 0,060 | 0,060 | <b>0,250 (4x)</b> | 0,060 |
| 917                     | 0,120 | <b>0,250 (2x)</b>        | 0,120 | 0,120 | ND                |       |
| <i>T. rubrum</i>        | 28189 | 0,030                    | 0,030 | ND    | 0,030             | ND    |
|                         | 320   | 0,060                    | 0,060 | ND    | <b>0,250 (2x)</b> | ND    |
|                         | III   | 0,120                    | 0,120 | ND    | 0,120             | ND    |
|                         | 855   | 0,120                    | 0,120 | ND    | 0,120             | ND    |
|                         | 916   | 0,060                    | 0,060 | ND    | 0,060             | ND    |

ND: não determinado.

A CIM de terbinafina variou de 0,003 a 0,030  $\mu\text{g/mL}$  para *T. interdigitale* e *T. rubrum*. Além disso, a CIM foi elevada para 917 AI, I AT, II AT, 865 AT e 320 AT (Tabela 8).

### 5.3 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AOS ANTIFÚNGICOS E DO ITRACONAZOL NO CRESCIMENTO RADIAL DOS DERMATÓFITOS

O crescimento radial dos conídios e do micélio das linhagens II, II AI, II 10pl, 865, 865 AI, 865 10pl, 917, 917 AI e 917 10pl na ausência e presença de itraconazol (0,25 µg/mL) foi mensurado (Figura 4).

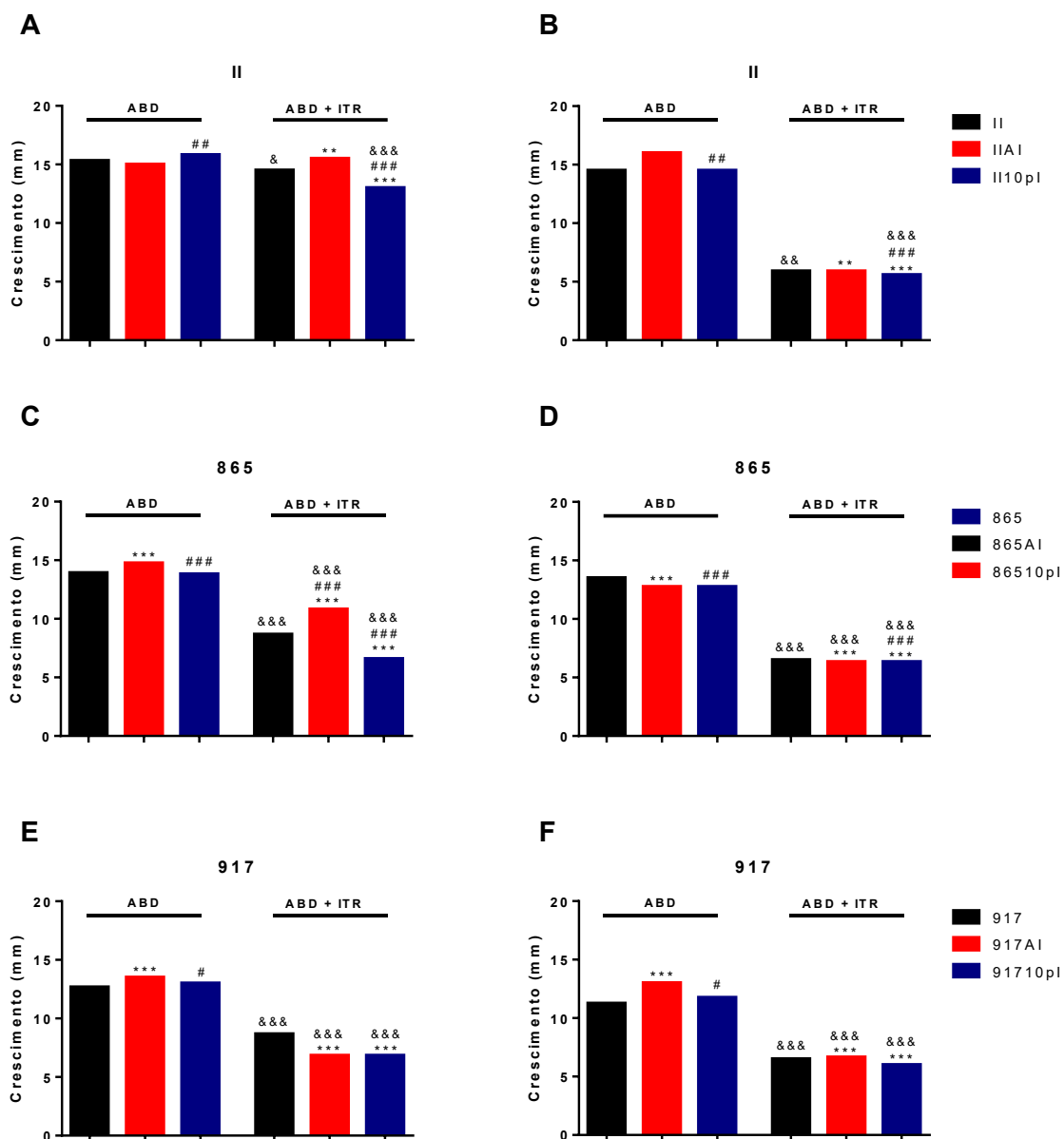
**Figura 4. Efeito da exposição aos antifúngicos e do itraconazol no crescimento dos fungos.**

Crescimento radial (mm) dos conídios (A, C e E) e do micélio (B, D e F) das linhagens II, II AI, II 10pl, 865, 865 AI, 865 10pl, 917, 917 AI e 917 10pl em ágar batata dextrose (ABD) e na presença de itraconazol (0,25 µg/mL; ABD + ITR).

\* Diferença significativa em relação as linhagens II, 865 ou 917 no mesmo meio de cultura.

# Diferença significativa em relação as linhagens II AI, 865 AI ou 917 AI no mesmo meio de cultura.

& Diferença significativa em relação ao mesmo grupo no meio de cultura sem itraconazol (ABD).



Para o crescimento conidial na presença do antifúngico, a linhagem II AI apresentou maior crescimento, enquanto II 10pl exibiu menor crescimento. As linhagens II AI e II 10pl apresentaram menor crescimento micelial na ausência de itraconazol (Figura 4.A-B).

Na avaliação do crescimento conidial, a linhagem 865 AI apresentou maior crescimento em ambos os meios de cultura. Também houve aumento do crescimento micelial para 865 AI em meio sem antifúngico. Por outro lado, foi observado menor crescimento desta linhagem em meio suplementado com itraconazol. A linhagem 865 10pl apresentou menor crescimento micelial e conidial na ausência e na presença de itraconazol (Figura 4.C-D).

A linhagem 917 AI apresentou maior crescimento conidial e micelial na ausência do antifúngico. Na presença de itraconazol, houve maior crescimento micelial e menor crescimento conidial da linhagem 917 AI. Já a linhagem 917 10pl exibiu menor crescimento conidial e micelial na presença do antifúngico (Figura 4.E-F). Além disso, a velocidade média de crescimento dos conídios e do micélio de cada uma das linhagens na ausência e presença de itraconazol foi determinada (Tabela 9).

**Tabela 9.** Velocidade média (mm/dia) de crescimento das linhagens II, 865, 917 e seus respectivos clones menos susceptíveis (AI) e após 10 passagens em meio na ausência de itraconazol (10pl) em ágar batata dextrose (ABD) e na presença de itraconazol (ABD + ITR). Os valores entre parênteses indicam o percentual de crescimento da linhagem sob o respectivo controle em meio na ausência de itraconazol.

\* Diferença significativa em relação a linhagem não exposta ao antifúngico (II, 865 ou 917) no mesmo meio de cultura.

| Linhagem | Velocidade média (mm/dia) |      |         |      |                 |      |                  |      |
|----------|---------------------------|------|---------|------|-----------------|------|------------------|------|
|          | ABD                       |      |         |      | ABD + ITR       |      |                  |      |
|          | Conídio                   | DP   | Micélio | DP   | Conídio         | DP   | Micélio          | DP   |
| II       | 4,42                      | 0,38 | 3,00    | 0,20 | 4,32 (94,55%)   | 0,56 | 0,57 (41,38%)    | 0,07 |
| II AI    | 4,28                      | 0,20 | 3,42    | 0,20 | 4,25 (103,33%)  | 0,47 | 0,57 (37,50%)    | 0,07 |
| II 10pl  | 4,52                      | 0,08 | 3,00    | 0,00 | 3,43 * (82,10%) | 0,68 | 0,43 ** (39,07%) | 0,07 |
| 865      | 3,94                      | 0,13 | 2,50    | 0,10 | 2,49 (62,63%)   | 0,37 | 0,71 (50,64%)    | 0,26 |
| 865 AI   | 4,21 *                    | 0,17 | 2,71    | 0,00 | 3,06 (125,04%)  | 0,30 | 0,64 (46,93%)    | 0,18 |
| 865 10pl | 3,94                      | 0,08 | 2,50    | 0,10 | 1,83 (61,51%)   | 0,48 | 0,64 (49,36%)    | 0,08 |
| 917      | 3,61                      | 0,08 | 2,07    | 0,30 | 2,49 (17,33%)   | 0,33 | 0,71 (57,34%)    | 0,00 |
| 917 AI   | 3,85                      | 0,25 | 2,57    | 0,00 | 1,93 (13,67%)   | 0,56 | 0,71 (51,27%)    | 0,20 |
| 917 10pl | 3,71                      | 0,57 | 2,21    | 0,10 | 1,96 (13,67%)   | 0,54 | 0,57 (50,70%)    | 0,11 |

ABD: ágar batata dextrose; ITR: itraconazol; DP: desvio padrão.

Os conídios da linhagem 865 AI apresentaram maior velocidade média de crescimento quando comparado com a linhagem 865 na ausência do itraconazol.

Em contrapartida, a linhagem II 10pl apresentou menor crescimento conidial e micelial na presença do antifúngico.

#### 5.4 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AOS ANTIFÚNGICOS E DO ITRACONAZOL NA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS

A germinação de conídios das linhagens não expostas aos antifúngicos, AI e 10pl foi quantificada na ausência e presença do antifúngico itraconazol (0,25 µg/mL) (Figura 5).



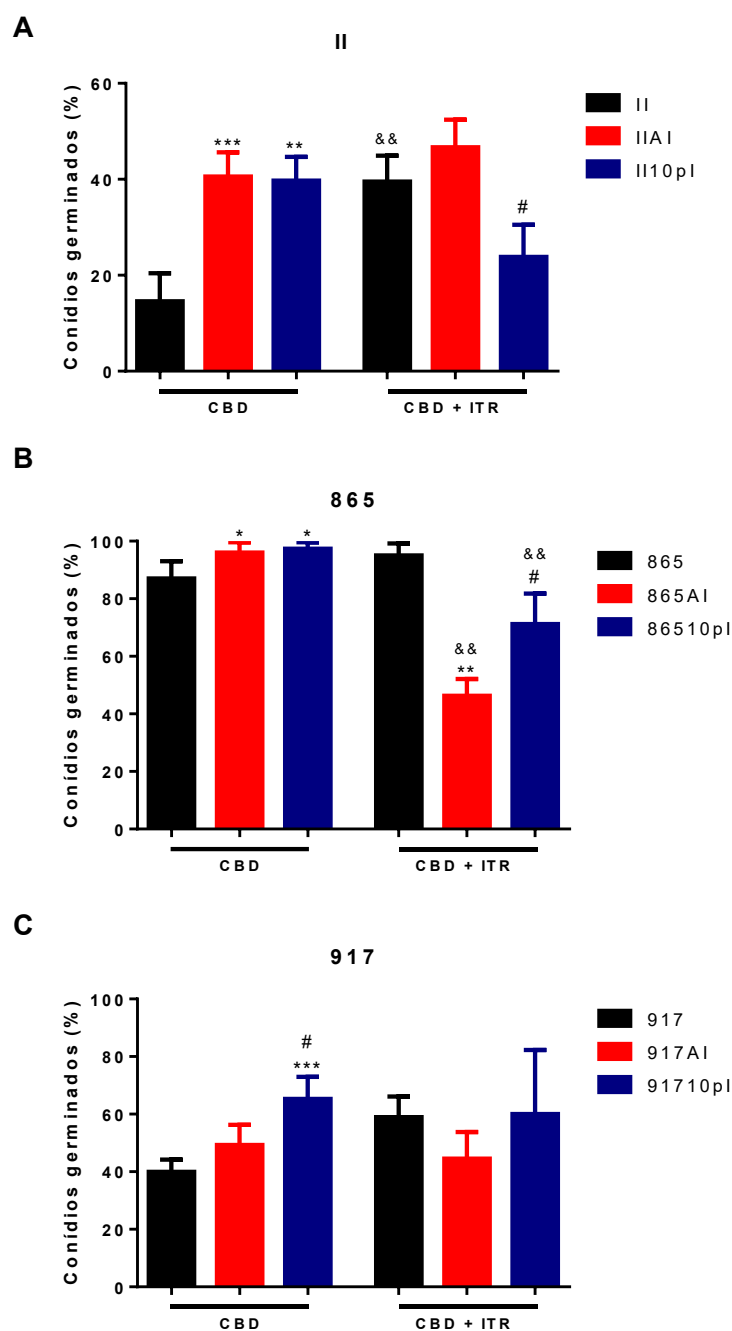
**Figura 5. Efeito da exposição aos antifúngicos e do itraconazol na germinação de conídios.**

Percentual de conídios germinados para as linhagens (A) II, (B) 865 e (C) 917 e seus respectivos clones AI e 10pl após 24 horas em caldo batata dextrose (CBD) e na presença de itraconazol (0,25 µg/mL; CBD + ITR).

\* Diferença significativa em relação a linhagem não exposta ao antifúngico (II, 865 ou 917) no mesmo meio de cultura.

# Diferença significativa em relação ao mesmo grupo, no meio de cultura sem itraconazol (ABD).

& Diferença significativa em relação a linhagem AI no mesmo meio de cultura.



Na ausência do antifúngico, as linhagens II AI, II 10pl, 865 AI, 865 10pl e 917 10pl apresentaram maior crescimento em relação as suas respectivas linhagens não expostas aos antifúngicos (Figura 5.A-C). Na presença do itraconazol, a linhagem 865 AI apresentou menor crescimento em relação a linhagem 865 (Figura 5.B).

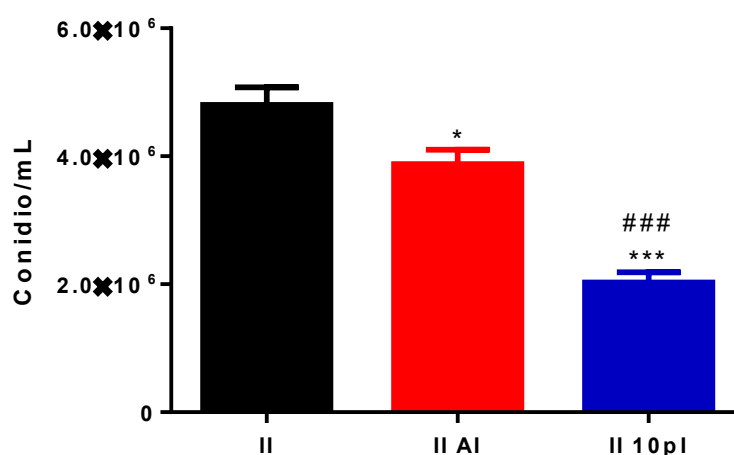
## 5.5 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO ITRACONAZOL NA CONIDIAÇÃO

A conidiação das linhagens II, II AI e II 10pl foi mensurada (Figura 6).

**Figura 6. Efeito da exposição aos antifúngicos e do itraconazol na conidiação.** Número de conídios (conídios/mL) produzidos pelas linhagens II, II AI e II 10pl após 7 dias em ágar batata dextrose (ABD).

\* Diferença significativa em relação a linhagem II.

# Diferença significativa em relação a linhagem II AI.



A conidiação foi diminuída para a linhagem II AI e, ainda mais reduzida para a linhagem II 10pl quando comparado a linhagem não exposta ao antifúngico (Figura 6).

## 5.6 EFEITO DE XENOBIÓTICOS E OUTROS ANTIFÚNGICOS NO CRESCIMENTO CONIDIAL E MICELIAL

### 5.6.1 Xenobióticos que atuam na Parede Celular e Sorbitol

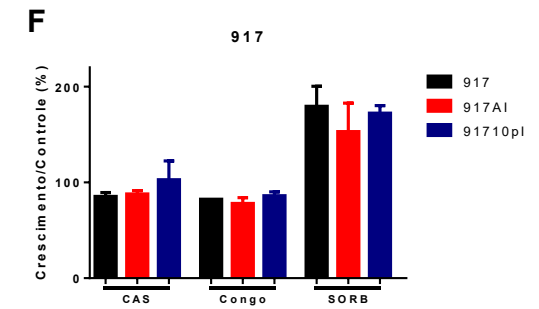
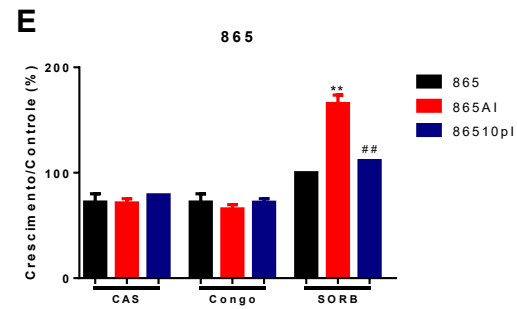
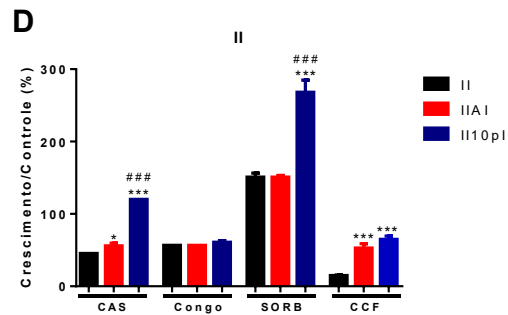
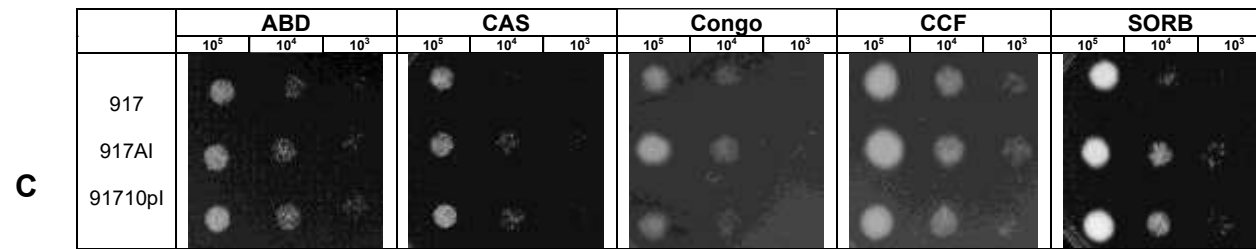
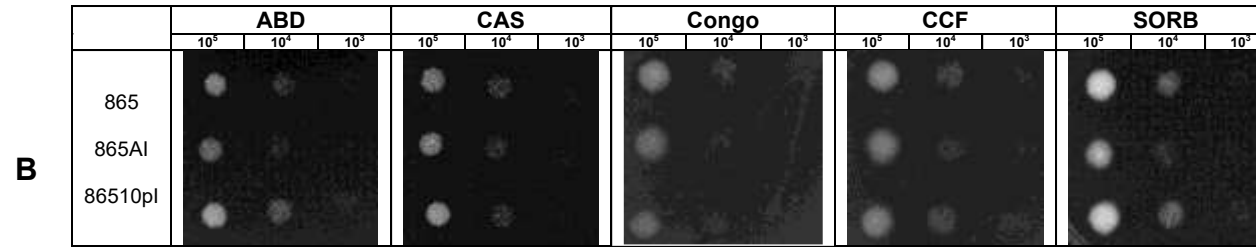
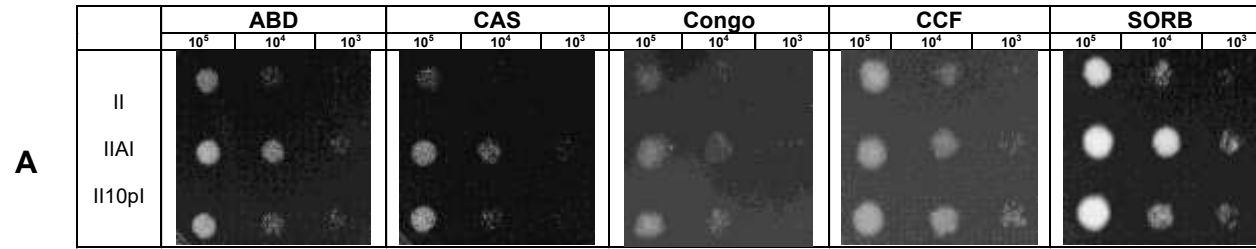
O crescimento conidial das linhagens II, II AI, II 10pl, 865, 865 AI, 865 10pl, 917, 917 AI e 917 10pl em ABD, CAS, SORB, CCF e Congo e a porcentagem de

crescimento micelial em relação ao meio ABD micelial foram determinados (Figura 7).

**Figura 7. Efeito da exposição aos antifúngicos e do itraconazol no crescimento dos fungos na presença de estressores de parede celular e do estabilizante osmótico sorbitol.** Crescimento conidial das linhagens (A) II, (B) 865 e (C) 917 e seus respectivos clones AI e 10pl nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  UFC/mL em ágar batata dextrose (ABD) e na presença de caspofungina (CAS), sorbitol (SORB), calcoflúor (CCF) e vermelho congo (congo). Porcentagem do crescimento micelial das linhagens (D) II, (E) 865 e (F) 917 e seus respectivos clones AI e 10pl em CAS, Congo, SORB e CCF em relação ao controle (crescimento em meio ABD).

\* Diferença significativa em relação a linhagem não exposta ao antifúngico (II, 865 ou 917);

# Diferença significativa em relação a linhagem IIAI, 865AI ou 917AI.



No crescimento micelial, a linhagem II AI exibiu maior razão quando comparado a linhagem não exposta na presença de CAS e CCF. Já a linhagem II 10pl apresentou maior razão de crescimento em CAS, SORB e CCF (Figura 7.D). No que diz respeito ao grupo 865, foi observada diferença estatística da linhagem 865 AI em relação a 865 em SORB (Figura 7.E). Entre a linhagem 917 e seus clones, nenhuma diferença foi observada (Figura 7.F).

### 5.6.2 Xenobióticos que atuam na Membrana Celular e Conteúdo de Ergosterol

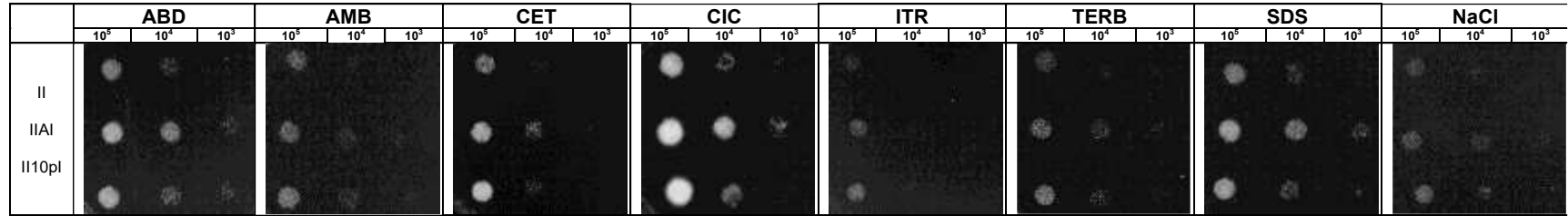
O crescimento conidial e micelial das linhagens II, II AI e II 10pl foi determinado em ABD, AMB, CET, CIC, ITR e TERB. O conteúdo de ergosterol e a razão deste conteúdo sob o grupo controle também foi quantificado (Figura 8).

**Figura 8. Efeito da exposição aos antifúngicos na susceptibilidade a compostos e agentes antifúngicos que atuam na membrana celular.** (A) Crescimento de conídios das linhagens II, II AI e II 10pl em ágar batata dextrose (ABD) e na presença de anfotericina B (AMB), cetoconazol (CET), ciclopirox (CIC), itraconazol (ITR), terbinafina (TERB), dodecil sulfato de sódio (SDS) e cloreto de sódio (NaCl). (B) Razão do crescimento micelial das linhagens II, II AI e II 10pl em meio ABD suplementado com AMB, CET, ITR, TERB, SDS, NaCl e amorolfina (AMO) sobre o controle (crescimento em meio ABD). (C) Conteúdo de ergosterol ( $\mu\text{g/mL}$ ) das linhagens II, IIA e II10p e (D) razão do conteúdo de ergosterol das linhagens II AI e II 10pl sobre a linhagem II.

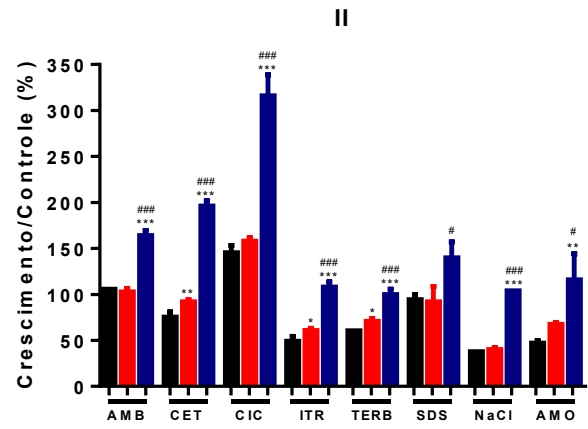
\* Diferença significativa em relação a linhagem II.

# Diferença significativa em relação a linhagem II AI.

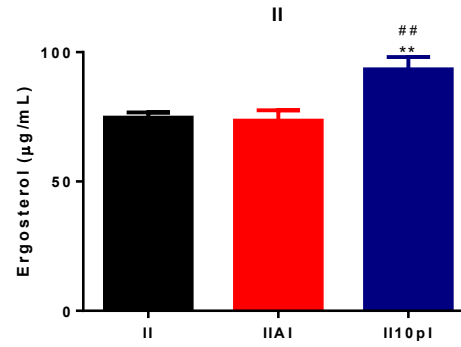
**A**



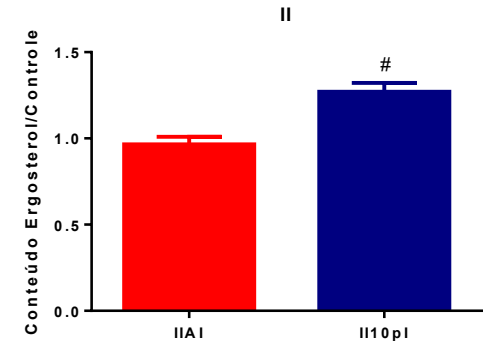
**B**



**C**



**D**



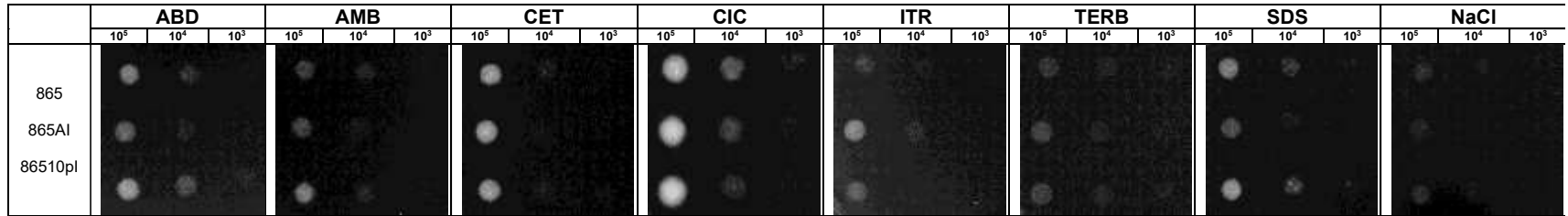
A linhagem II AI apresentou razão de crescimento micelial maior que a do controle diante dos xenobióticos CET, ITR e TERB. Já a linhagem II 10pl exibiu este mesmo comportamento frente a AMB, CET, CIC, ITR, TERB, SDS, NaCl e AMO. (Figura 7.B). Além disso, foi observado que essa linhagem possui um maior conteúdo de ergosterol quando comparado a linhagem II e II AI (Figura 7.C-D).

**Figura 9. Efeito da exposição aos antifúngicos na susceptibilidade a compostos e a agentes antifúngicos que atuam na membrana celular.** (A) Crescimento de conídios das linhagens 865, 865 AI e 865 10pl em ágar batata dextrose (ABD) e na presença de anfotericina B (AMB), cetoconazol (CET), ciclopirox (CIC), itraconazol (ITR), terbinafina (TERB), dodecil sulfato de sódio (SDS) e cloreto de sódio (NaCl). (B) Razão do crescimento micelial das linhagens 865, 865 AI e 865 10pl em meio ABD suplementado com AMB, CET, ITR, TERB, SDS, NaCl e amorolfina (AMO) sobre o controle (crescimento em meio ABD). (C) Conteúdo de ergosterol ( $\mu\text{g/mL}$ ) das linhagens 865, 865A e 86510p e (D) razão do conteúdo de ergosterol das linhagens 865 AI e 865 10pl sobre a linhagem 865.

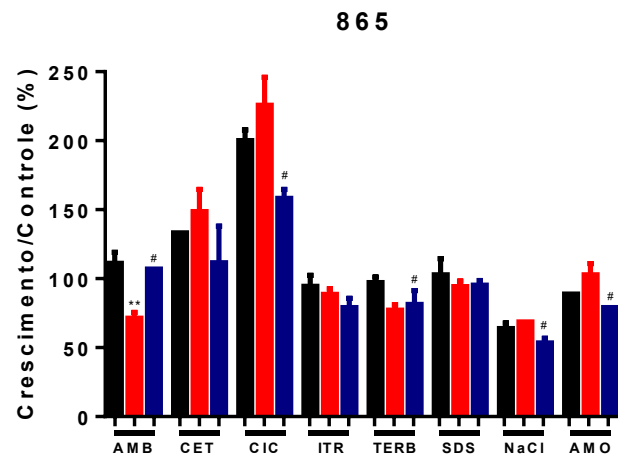
\* Diferença significativa em relação a linhagem 865.

# Diferença significativa em relação a linhagem 865 AI.

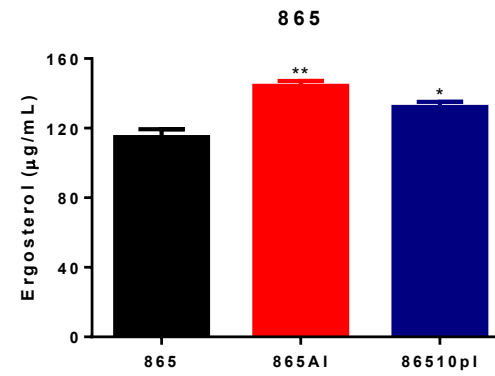
A



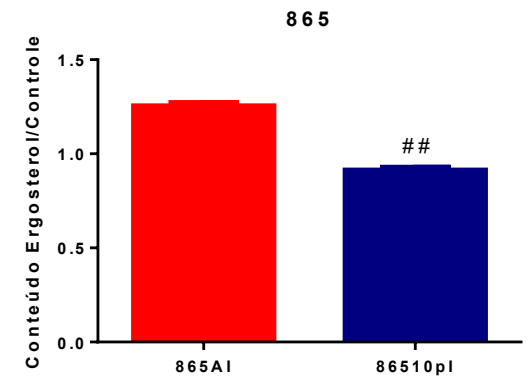
B



C



D





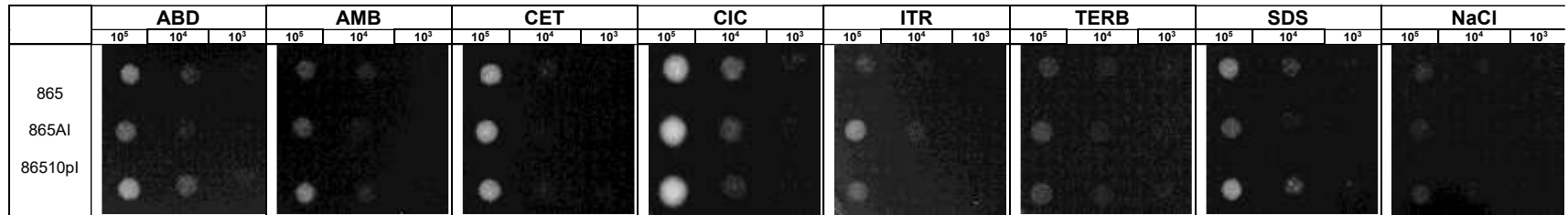
A linhagem 865 AI apresentou menor razão de crescimento micelial quanto comparado a 865 em AMB (Figura 9.B). A linhagem 865 10pl apresentou razão diferente da linhagem AI em AMB, CIC, TERB, NaCl e AMO. O conteúdo de ergosterol foi significativamente maior nas linhagens 865 AI e 865 10pl (Figura 9.C). Em contrapartida, a linhagem 865 10pl apresenta um conteúdo menor de ergosterol em relação ao controle e significativamente menor que a 865 AI (Figura 9.D).

**Figura 10. Efeito da exposição aos antifúngicos na susceptibilidade a compostos e a agentes antifúngicos que atuam na membrana celular.** (A) Crescimento de conídios das linhagens 917, 917 AI e 917 10pl em ágar batata dextrose (ABD) e na presença de anfotericina B (AMB), cetoconazol (CET), ciclopirox (CIC), itraconazol (ITR), terbinafina (TERB), dodecil sulfato de sódio (SDS) e cloreto de sódio (NaCl). (B) Razão do crescimento micelial das linhagens 917, 917 AI e 917 10pl em meio ABD suplementado com AMB, CET, ITR, TERB, SDS, NaCl e amorolfina (AMO) sobre o controle (crescimento em meio ABD). (C) Conteúdo de ergosterol ( $\mu\text{g/mL}$ ) das linhagens 917, 917A e 91710p e (D) razão do conteúdo de ergosterol das linhagens 917 AI e 917 10pl sobre a linhagem 917.

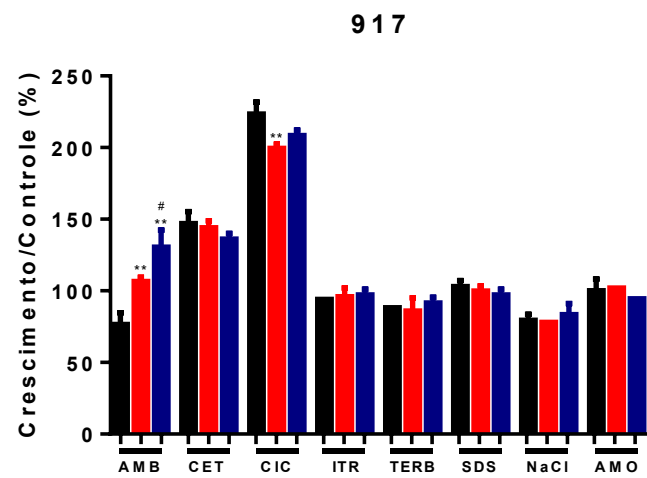
\* Diferença significativa em relação a linhagem 917.

# Diferença significativa em relação a linhagem 917 AI.

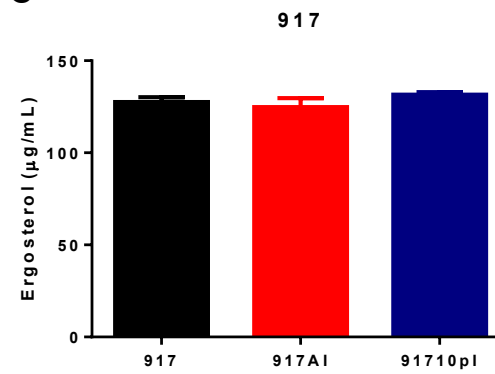
A



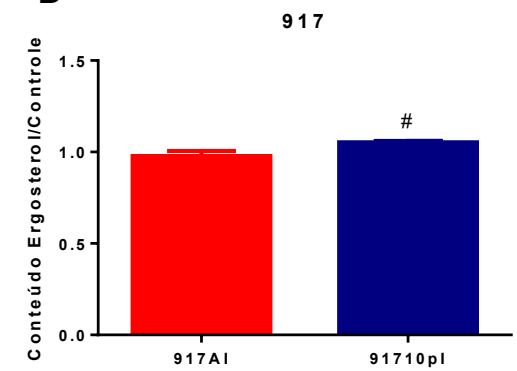
B



C



D



A razão de crescimento micelial foi maior em 917 AI e 917 10pl em AMB. Já em CIC, essa razão foi menor para 917 AI (Figura 10.B). Não houve diferença no conteúdo de ergosterol (Figura 10.C), mas o ergosterol constitutivo foi maior em 917 10pl quando comparado a 917 AI (Figura 10.D).

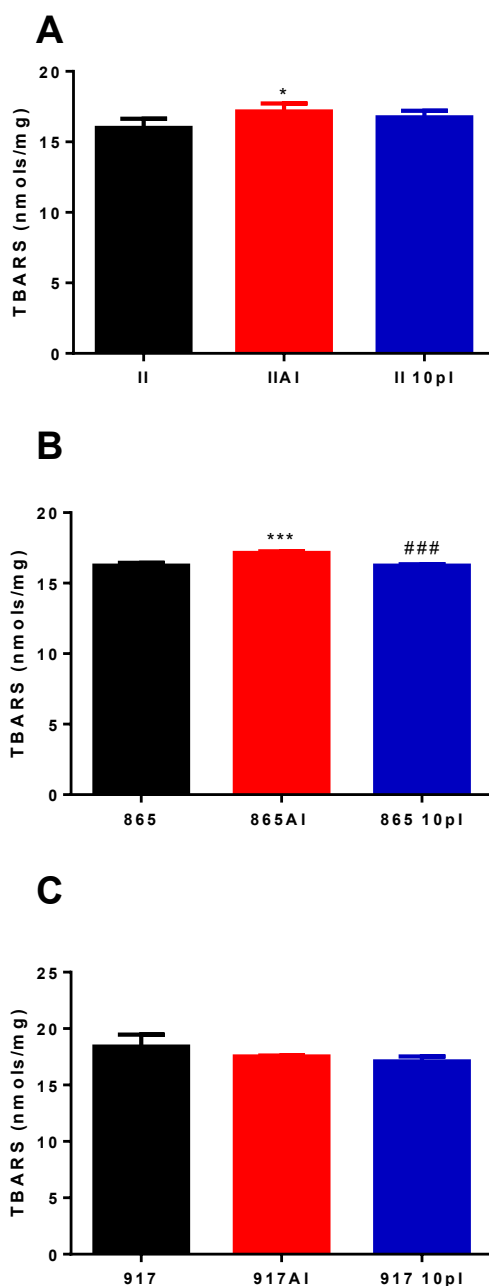
## 5.7 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica das diferentes linhagens foi determinada (Figura 11).

**Figura 11. Efeito da exposição aos antifúngicos na peroxidação lipídica.** Quantificação da peroxidação lipídica das linhagens (A) II, (B) IIAI e (C) II 10pl.

\* Diferença significativa em relação a linhagem não exposta ao antifúngico (II, 865 ou 917).

# Diferença significativa em relação a linhagem 865 AI.



Houve aumento da peroxidação lipídica da linhagem II AI quando comparado a sua respectiva linhagem não exposta ao antifúngico (Figura 11.A). Além disso, houve aumento da peroxidação em 865 AI e redução em 865 10pl quando comparado a 865 AI (Figura 11.B).

## 5.8 QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA, MATRIZ EXTRACELULAR E ATIVIDADE METABÓLICA DO BIOFILME

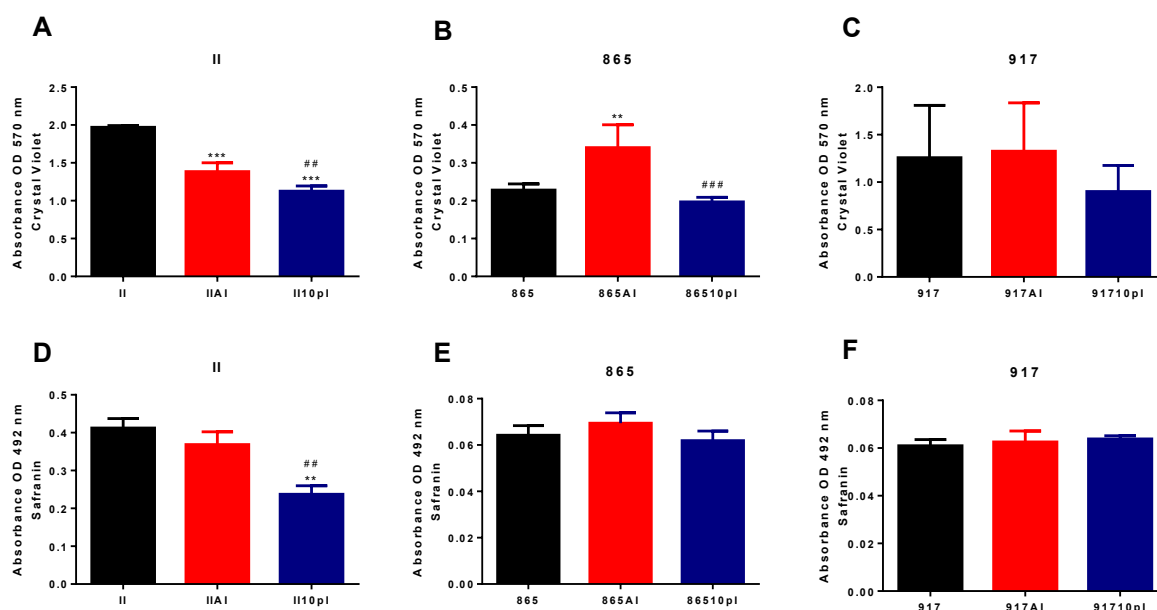
A biomassa do biofilme e matriz extracelular formadas pelas diferentes linhagens foi quantificada (Figura 12).

### Figura 12. Efeito da exposição aos antifúngicos na produção de biofilme e matriz extracelular.

(A, B, C) Biomassa do biofilme e (D, E e F) matriz extracelular das linhagens II, 865, 917 e seus respectivos clones AI e 10pl.

\* Diferença significativa em relação a respectiva linhagem não exposta ao antifúngico.

# Diferença significativa em relação a respectiva linhagem AI.



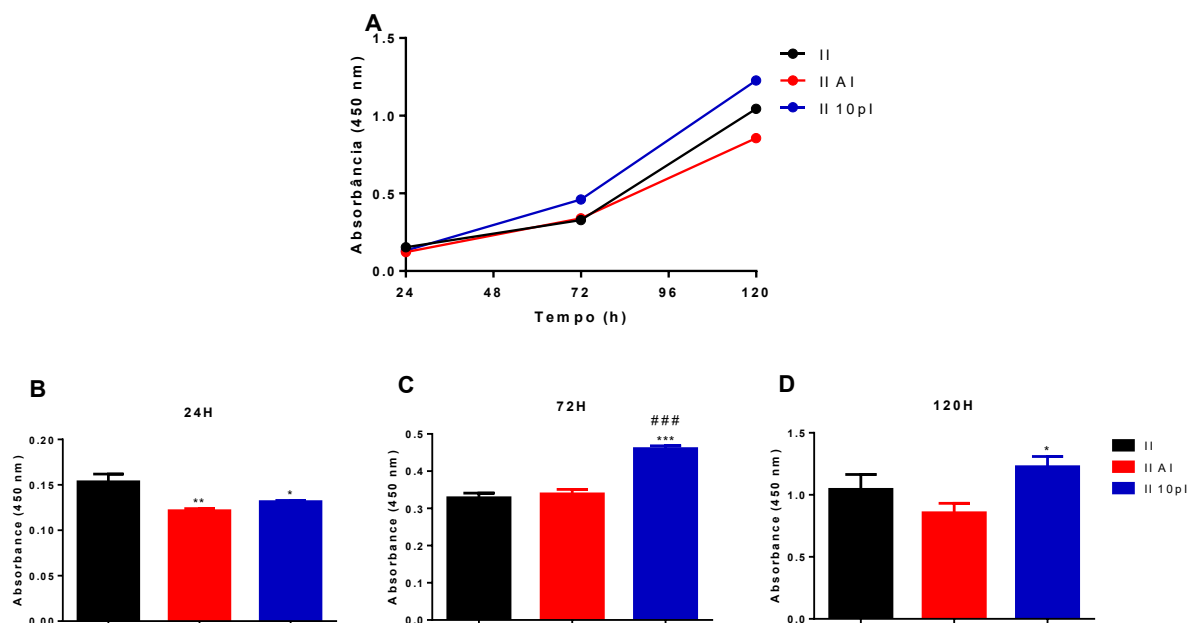
As linhagens II AI e II10pl apresentaram menor biomassa quando comparado a II (Figura 12.A). Já a linhagem 865 AI produziu maior biomassa quando comparado a 865 (Figura 12.B). No que diz respeito a matriz extracelular, a linhagem II 10pl apresentou menor produção quando comparado a linhagem II (Figura 12.D). Para as outras linhagens, não foi observada diferença (Figura 12.C, E e F).

Além disso, a atividade metabólica do biofilme das linhagens II, IIAI e II 10pl também foi quantificada (Figura 13).

**Figura 13. Efeito da exposição aos antifúngicos na atividade metabólica de biofilme.** (A) Cinética da atividade metabólica do biofilme de II, II AI e II 10pl após 24, 72 e 120 horas de maturação. Atividade metabólica do biofilme após (B) 24, (C) 72 e (D) 120 horas de atividade.

\* Diferença significativa em relação a linhagem II.

# Diferença significativa em relação a linhagem II AI.

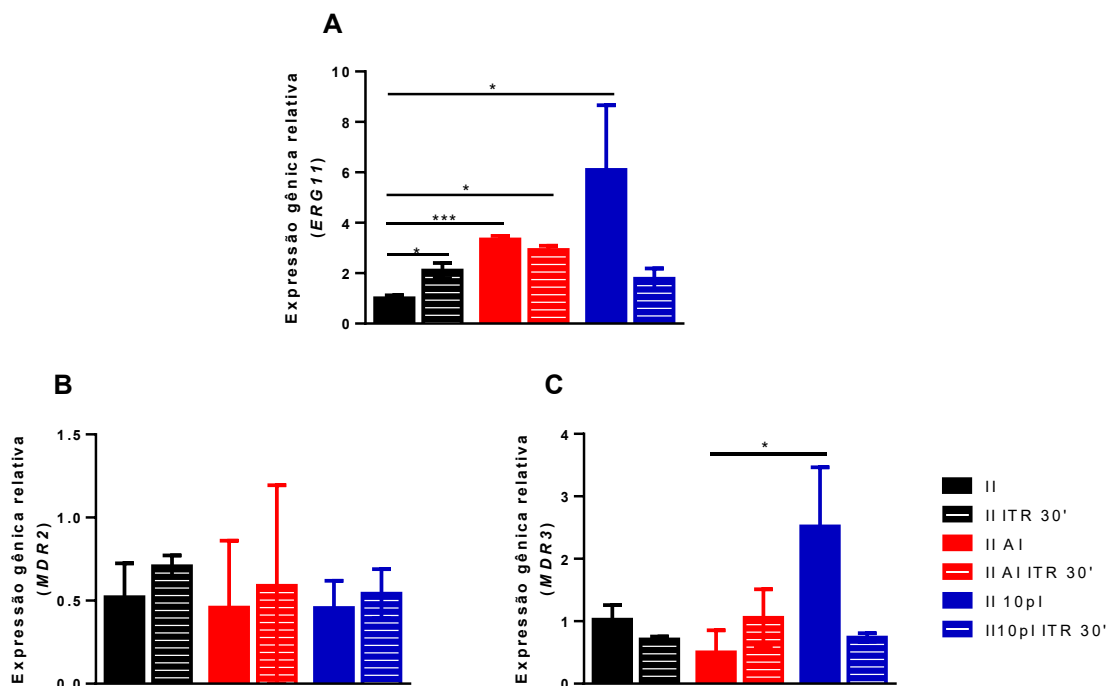


A atividade de II AI e II 10pl é reduzida no tempo de 24 horas (Figuras 13.A e B), mas para II 10pl há um aumento gradativo, de modo que ela se torna maior quando comparado a linhagem não exposta ao antifúngico nos tempos de 72 e 120 horas (Figuras 13.A, C e D).

## 5.9 EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão relativa dos genes ERG11, MDR2 e MDR3 foi determinada (Figura 14).

**Figura 14.** Expressão relativa dos genes (A) *ERG11*, (B) *MDR2* e (C) *MDR3* nas linhagens II, IIAI e II 10pl não expostas e expostas ao itraconazol (ITR) por 30 minutos (ITR 30'). \* Diferença significativa.



As linhagens II AI e II 10pl, assim como II, II AI expostas a ITR por 30 minutos tiveram maior expressão do gene *ERG11* (Figura 14.A). Além disso, a linhagem II 10pl exibiu maior expressão de *MDR3* quando comparado a linhagem II AI (Figura 14.C).

## 5.10 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AOS ANTIFÚNGICOS NA INTERAÇÃO COM MACRÓFAGOS E NA SUSCEPTIBILIDADE AO ESTRESSE OXIDATIVO

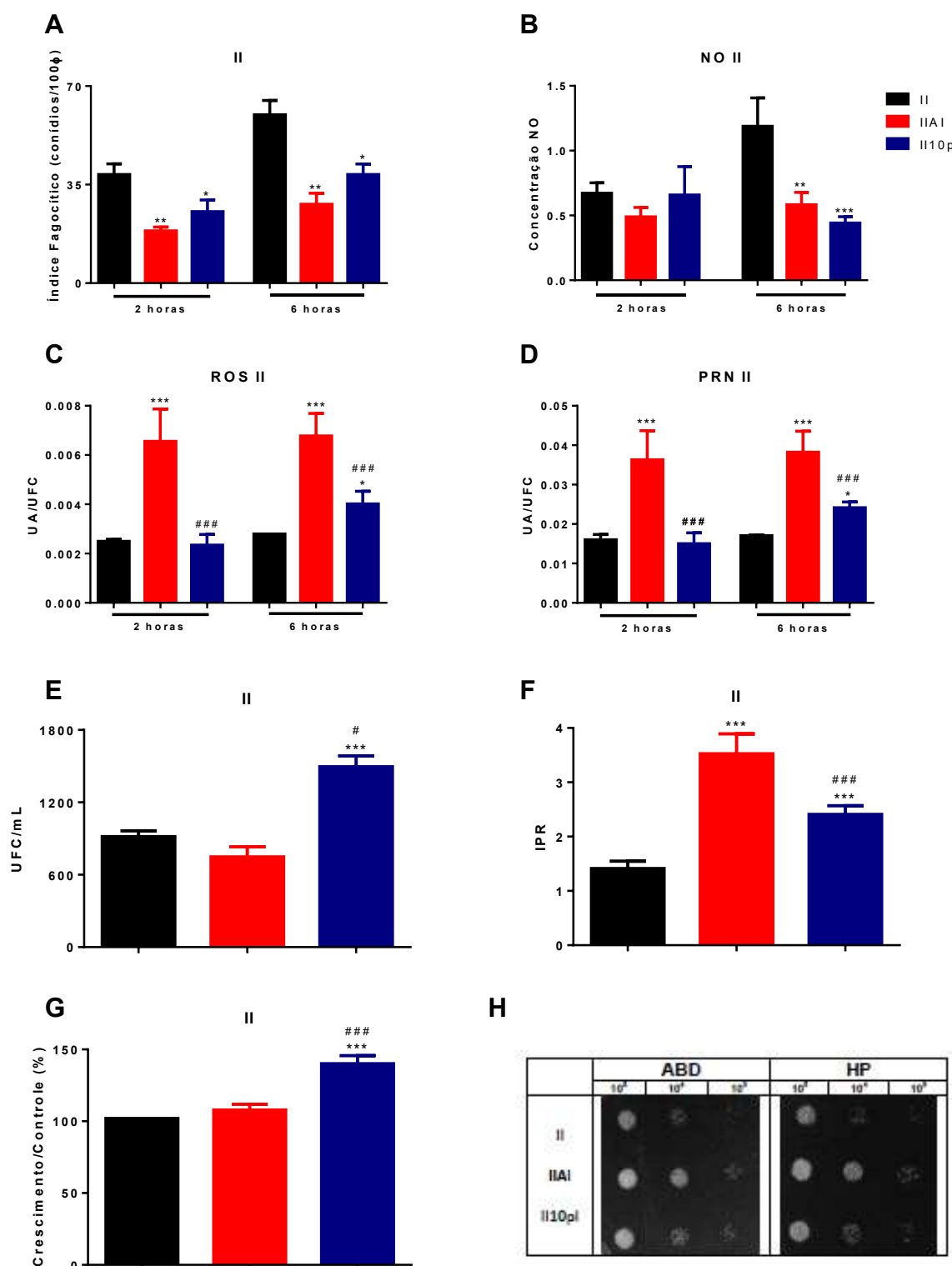
Para avaliar a influência da menor susceptibilidade aos antifúngicos na patogenicidade e na susceptibilidade ao estresse oxidativo, a interação das linhagens de dermatófitos com macrófagos derivados de medula óssea e o crescimento na presença de peróxido de hidrogênio foram avaliados. Os dados relativos à linhagem II e seus clones AI e 10pl estão descritos na Figura 15.

**Figura 15. Efeito da exposição aos antifúngicos na interação de *T. interdigitale* e macrófagos e na susceptibilidade ao estresse oxidativo.** (A) Índice fagocítico, (B) produção de NO, (C) razão UA/UFC de ROS e (D) de PRN, (E) exocitose (6h), (F) proliferação intracelular (IPR), (G) razão do crescimento micelial das linhagens II, II AI e II 10pl em meio ABD suplementado com peróxido de hidrogênio (HP) sobre o controle (crescimento em ABD) e (H) crescimento de conídios das linhagens II, II AI e II 10pl em meio contendo HP.

\* Diferença significativa em relação a linhagem II.

# Diferença significativa em relação a linhagem II AI.





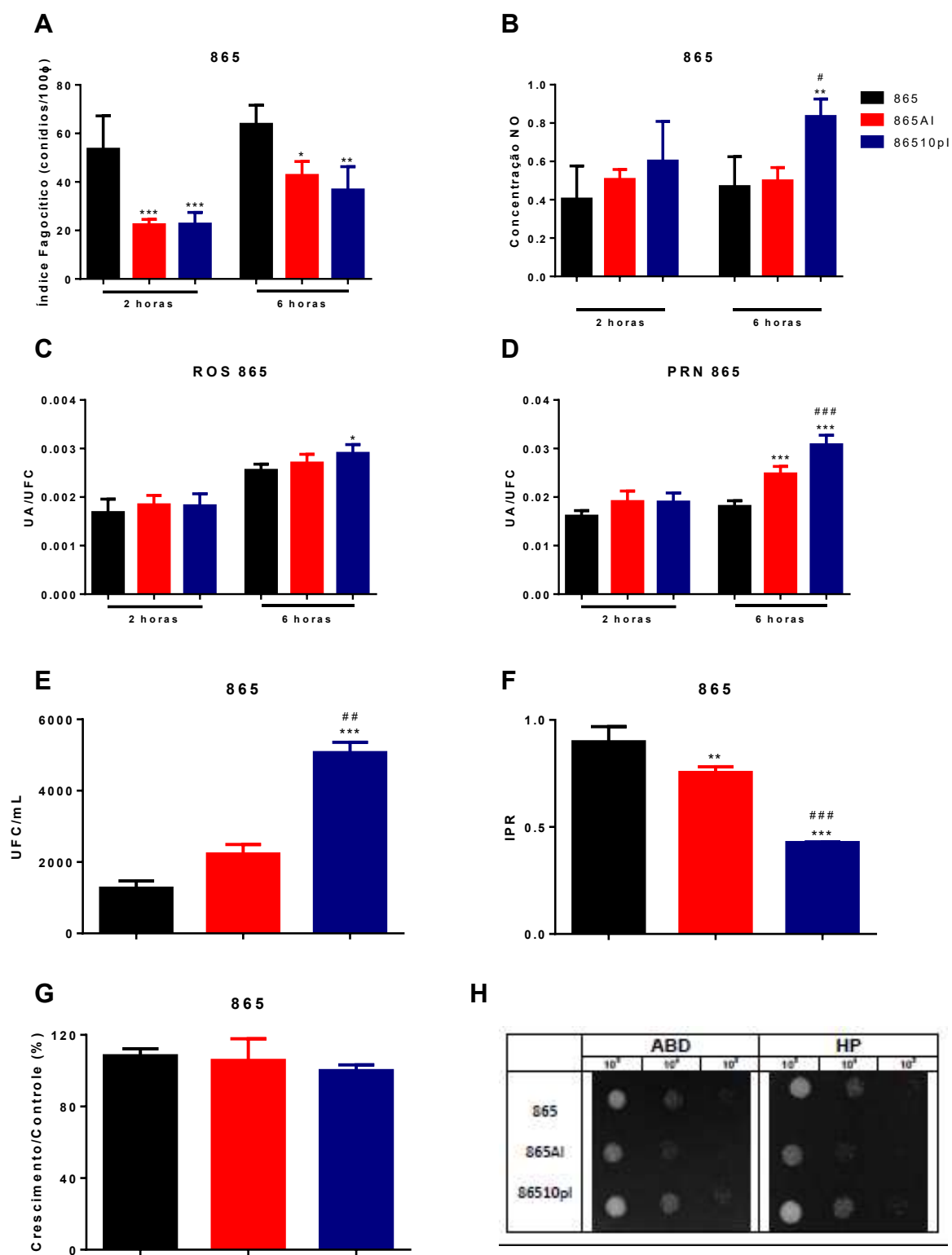
O índice fagocítico das linhagens II AI e II 10pl foi menor em ambos os tempos em relação a linhagem II (Figura 15.A). A produção de NO foi menor para II AI e II 10pl no tempo de 6 horas (Figura 15.B) e a razão UA/UFC de ROS e PRN foi

maior para II AI em 2 horas e maior para II 10pl em ambos os tempos (Figuras 15.C e 15.D). A exocitose foi aumentada para a linhagem II 10pl (Figura 15.E). Além disso, a taxa de proliferação intracelular (IPR) foi elevada para II AI e II 10pl (Figura 15.F). A razão de crescimento micelial foi maior para II 10pl (Figura 15.G). Os mesmos ensaios foram realizados para a linhagem 865. Os resultados estão descritos na Figura 16.

**Figura 16. Efeito da exposição aos antifúngicos na interação de *T. interdigitale* e macrófagos e na susceptibilidade ao estresse oxidativo.** (A) Índice fagocítico, (B) produção de NO, (C) razão UA/UFC de ROS e (D) de PRN, (E) exocitose, (F) proliferação intracelular (IPR), (G) razão do crescimento micelial das linhagens 865, 865 AI e 865 10pl em meio ABD suplementado com peróxido de hidrogênio (HP) sobre o controle (crescimento em ABD) e (H) crescimento de conídios das linhagens 865, 865 AI e 865 10pl em meio contendo HP.

\* Diferença significativa em relação a linhagem 865.

# Diferença significativa em relação a linhagem 865 AI.

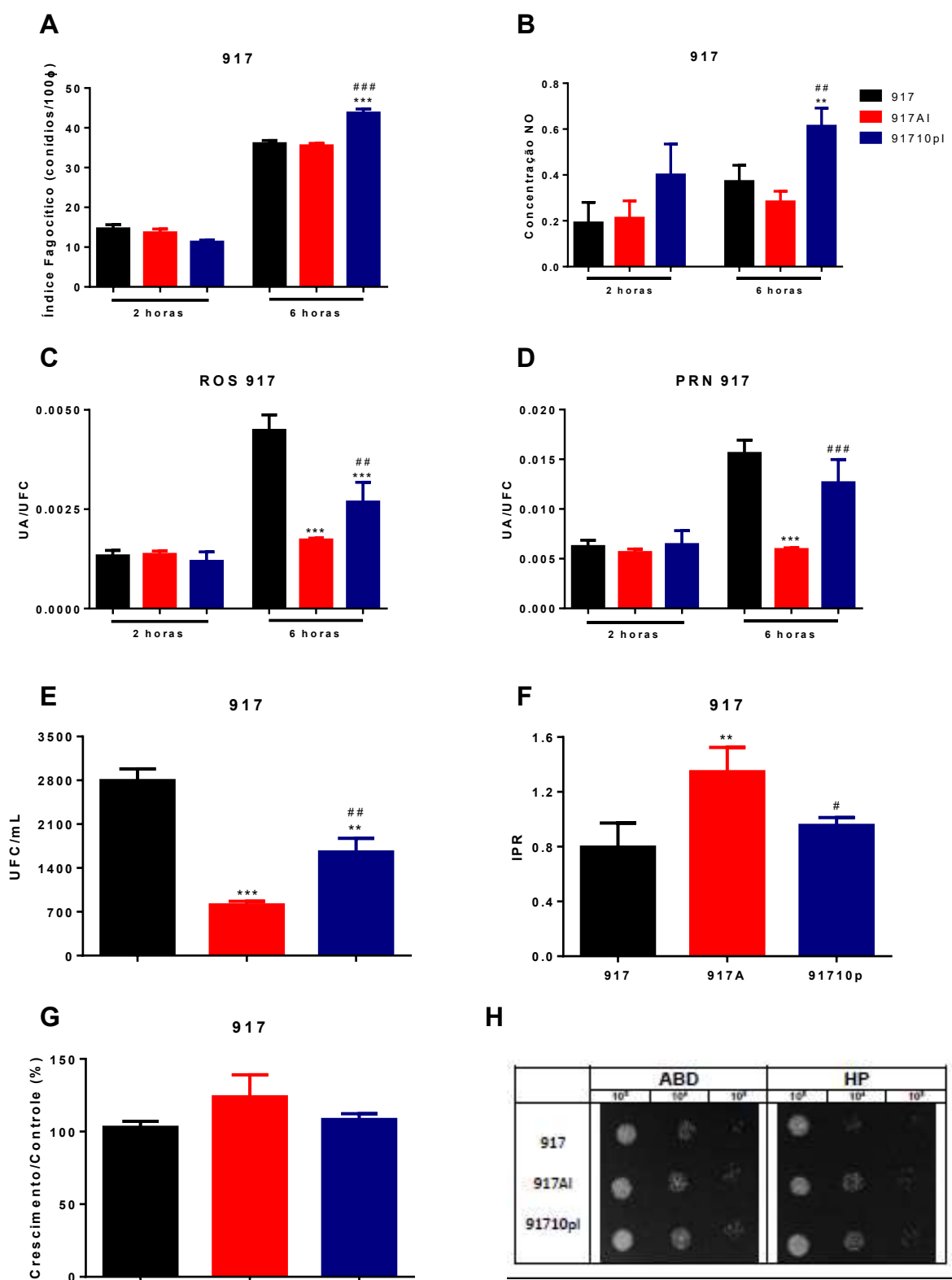


Houve menor índice fagocítico das linhagens 865 AI e 865 10pl em ambos os tempos quando comparado a linhagem não exposta ao antifúngico (Figura 16.A). A produção de NO foi aumentada apenas para 865 10pl em 6 horas (Figura 16.B). Além disso, houve maior razão UA/UFC e maior produção de NO para a linhagem 865 10pl no tempo de 6 horas e de PRN para as linhagens 865 AI e 865 10pl neste mesmo tempo (Figuras 16.C e 16.D). A exocitose também foi maior para a linhagem 865 10pl (Figura 16.E). A IPR foi menor em 865 AI e 865 10pl (Figura 16.F). Entretanto, o crescimento micelial não demonstrou diferença na presença de HP (Figura 16.G).

**Figura 17. Efeito da exposição aos antifúngicos na interação de *T. interdigitale* e macrófagos e na susceptibilidade ao estresse oxidativo.** (A) Índice fagocítico, (B) produção de NO, (C) razão UA/UFC de ROS e (D) de PRN, (E) exocitose, (F) proliferação intracelular (IPR), (G) razão do crescimento micelial das linhagens 917, 917 AI e 917 10pl em meio ABD suplementado com peróxido de hidrogênio (HP) sobre o controle (crescimento em ABD) e (H) crescimento de conídios das linhagens 917, 917 AI e 917 10pl em meio contendo HP.

\* Diferença significativa em relação a linhagem 917.

# Diferença significativa em relação a linhagem 917 AI.



A linhagem 917 10pl apresentou maior índice fagocítico no tempo de 6 horas (Figura 17.A). A produção de NO foi maior para 917 10pl no tempo de 6 horas (Figura 17.B) e a razão UA/UFC foi maior para 917 AI no tempo de 2 horas para ambas espécies reativas (ROS e PRN). Em contrapartida, a razão UA/UFC foi menor no tempo de 6 horas para 917 AI e 917 10pl também para ROS e PRN (Figuras 17.C e 17.D). A excitose foi menor para as linhagens 917 AI e 917 10pl (Figura 17.E). A IPR foi maior para 917 AI (Figura 17.F) e nenhuma diferença foi observada no crescimento em HP.

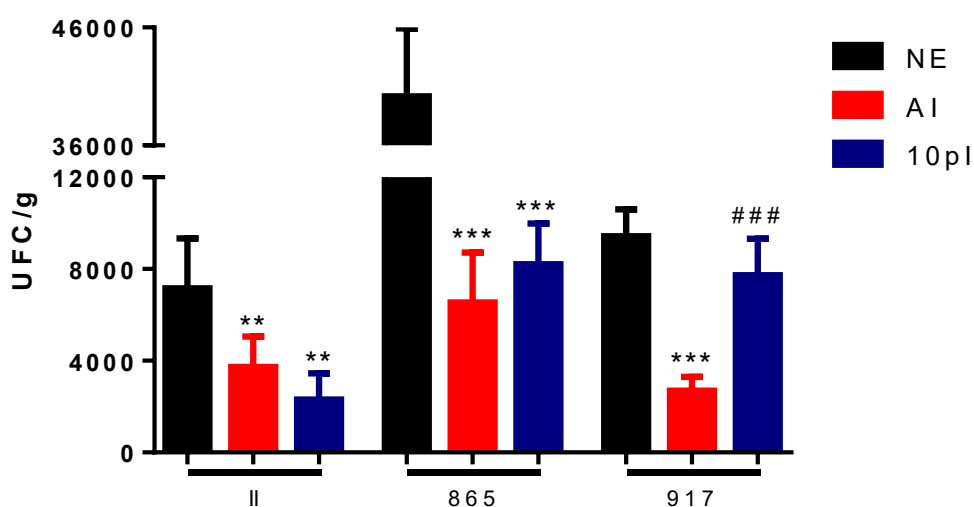
### 5.11 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AOS ANTIFÚNGICOS NA PATOGENICIDADE EM MODELO MURINO DE DERMATOFITOSE

A carga fúngica recuperada da pele dos animais infectados com as diferentes linhagens foi quantificada e os dados estão sumarizados na Figura 18.

**Figura 18. Efeito da exposição aos antifúngicos em modelo de infecção murino.** Recuperação de carga fúngica de animais infectados com as linhagens não expostas aos antifúngicos (NE), AI e 10pl. A recuperação ocorreu 7 dias pós-infecção.

\* Diferença significativa em relação a linhagem não exposta ao antifúngico.

# Diferença significativa em relação a linhagem AI.



Para a linhagem II AI e II 10pl, houve menor recuperação de carga fúngica em comparação a linhagem II. O mesmo perfil foi observado para as linhagens 865 AI e 865 10pl quando comparado a linhagem 865. No comparativo entre as linhagens 917, 917 AI e 917 10pl, 917 AI foi menos recuperada em comparação a linhagem não exposta ao antifúngico (917) (Figura 18).

## 6 DISCUSSÃO

O surgimento da resistência aos antifúngicos e a falha terapêutica decorrente desse processo trazem um problema de saúde pública (CATTÂNEO, 2008; SIONOV; CHANG; KWON-CHUNG, 2013). Em dermatófitos, a resistência envolve a participação de modificadores de enzimas-alvo, a superexpressão de bombas de efluxo e de proteínas relacionadas ao estresse (FACHIN *et al.*, 2006; PAIÃO *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2007). Portanto, neste capítulo demonstramos a influência da exposição ao itraconazol (ITR) e a terbinafina (TERB) na susceptibilidade, fisiologia, interação com macrófagos e virulência em modelo murino.

Inicialmente, observou-se que a exposição a ITR e a TERB acarreta menor susceptibilidade frente aos antifúngicos, sendo este processo mais recorrente em linhagens de *Trichophyton* expostas a ITR. Isso ocorreu provavelmente influenciado pela ação fungistática de ITR, o que pode ter resultado na seleção de subpopulações com diferentes perfis de susceptibilidade e contribuído com maior probabilidade para o processo de resistência a antifúngicos (FERREIRA *et al.*, 2004). Como TERB tem ação fungicida contra dermatófitos em baixas concentrações, a resistência é menos comum no tratamento com este antifúngico (GU *et al.*, 2020).

A menor susceptibilidade do fungo frente ao antifúngico a que ele foi exposto caracteriza um evento de resistência secundária (MARTINEZ-ROSSI *et al.*, 2018). A resistência secundária se caracteriza por uma alteração na susceptibilidade da população fúngica frente a determinado antifúngico devido a sua exposição contínua ao fármaco durante o tratamento. Ela se desenvolve entre linhagens que anteriormente eram susceptíveis e têm esse perfil de susceptibilidade alterada após a exposição ao antifúngico (KANAFANI; PERFECT, 2008). Neste caso, foi verificado que linhagens expostas a ITR e a TERB tiveram a CIM aumentada em até quatro vezes quando comparado a suas respectivas linhagens não expostas aos antifúngicos, indicando um evento de menor susceptibilidade ou mesmo de resistência secundária.

Além disso, foi observado que as linhagens com menor susceptibilidade a ITR e a TERB (AI e AT) exibiram aumento da CIM também para outros antifúngicos, em alguns casos de classes químicas diferentes. Esse processo caracteriza um evento denominado resistência cruzada e envolve, geralmente, mecanismos de eliminação



de drogas inespecíficos, como a superexpressão de bombas de efluxo (MARTINEZ-ROSSI *et al.*, 2008; BASTOS *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2019).

Após cessada a exposição aos antifúngicos, as linhagens com menor susceptibilidade ao itraconazol (AI) exibiram manutenção da CIM para este antifúngico. Diferentemente do observado por Ghelardi *et al.* (2014), foi constatado que as linhagens de *T. interdigitale* mantiveram resistência mesmo após a remoção do estímulo de exposição ao antifúngico. Em alguns casos, a resistência cruzada também foi mantida, caracterizando um processo de resistência cruzada permanente (BASTOS *et al.*, 2018). Neste estudo, a linhagem II 10pl manteve resistência cruzada para CET, AMO, CIC e TERB; a linhagem 865 10pl teve CIM aumentada também para CET, CIC e TERB; e 917 10pl exibiu manutenção da CIM para AMO. O fato de as linhagens permanecerem com o perfil de resistência secundária e resistência cruzada mesmo após cessada exposição a ITR sugere a seleção de clones com perfis de susceptibilidade diferenciados da linhagem não exposta ao antifúngico.

A estratégia utilizada para selecionar linhagens resistentes no estudo já havia sido empregada na adaptação de linhagens de *T. rubrum* que, quando expostas a doses subinibitórias de ITR, TERB e amorolfina (AMO), selecionaram subpopulações das linhagens capazes de sobreviver em maiores concentrações de antifúngicos (GHELARDI *et al.*, 2014). Verificado que estas linhagens exibiam perfil de susceptibilidade diferenciado, os parâmetros fisiológicos, a interação com macrófagos e a virulência em modelo murino foram analisados.

Em relação às linhagens II, II AI e II 10pl, pode-se observar que IIA apresentou maior crescimento na presença de ITR e que esse perfil também ocorre para outros compostos que atuam na membrana, como CET e SDS; na parede celular fúngica, como CAS, Congo, CCF e o osmoprotetor SORB. Da mesma forma, II10p exibiu maior crescimento na presença de ITR e CET e outros compostos que atuam na membrana celular como AMB, CIC, SDS, TERB e NaCl. II10p também exibiu crescimento aumentado na presença de CAS, Congo, CCF e do protetor osmótico SORB.

A menor susceptibilidade a drogas estruturalmente não relacionadas pode estar associada a superexpressão de bombas de efluxo. Para *T. rubrum*, foi demonstrado que o aumento da expressão de genes de três transportadores relacionados ao efluxo de drogas (*TruMDR1*, *TruMDR2* e *TruMDR3*) estava

associada ao mecanismo de resistência a uma droga específica, mas eles também atuavam frente a drogas quimicamente diferentes e diversos estressores (CERVELATTI *et al.*, 2006; PAIÃO *et al.*, 2007; MARANHÃO *et al.*, 2009; KRAAIJEVELD *et al.*, 2012; MONOD *et al.*, 2019). Desta forma, acredita-se que a capacidade de II 10pl crescer na presença de xenobióticos e antifúngicos com mecanismos de ação direcionados para diferentes alvos celulares pode estar associada a superexpressão do gene *MDR3* que codifica uma bomba de efluxo da família ABC. Além disso, é possível que a capacidade de II 10pl crescer na presença de agentes cujo mecanismo de ação é direcionado para a membrana celular pode estar associada ao aumento do teor de ergosterol observado para esta linhagem. Já II AI, apesar de apresentar maior crescimento em ITR, CTZ e SDS, tem aumento no conteúdo de TBARS, indicando peroxidação lipídica (FERREIRA *et al.*, 2013) provavelmente devido à exposição contínua a ITR. Esse fato pode explicar a diferença de susceptibilidade aos xenobióticos observada para essas duas linhagens.

No intuito de compreender como as linhagens II AI e II 10pl exibiram maior tolerância a ITR e a outros compostos, foi avaliada a expressão dos genes *ERG11*, *MDR2* e *MDR3*. Foi verificado que II AI e II 10pl apresentaram aumento da expressão gênica relativa de *ERG11*, gene que codifica a enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase, alvo de ITR. O aumento da expressão de *ERG11* também foi observado em *Candida glabrata* (RODRIGUES *et al.*, 2017) e *T. rubrum* (DIAO *et al.*, 2009) após o tratamento com voriconazol e itraconazol, respectivamente. Este perfil também foi observado para *C. gattii* exposto ao benomil, um fungicida ambiental (CARNEIRO *et al.*, 2020). Mais recentemente, Gnat *et al.* (2021) observou a superexpressão de *ERG11* em um *pool* de isolados de *T. verrucosum* resistentes ao fluconazol. Associado a manutenção dos níveis de ergosterol de II AI mesmo diante do aumento da peroxidação lipídica e ao aumento do conteúdo de ergosterol em II 10pl, acredita-se que a superexpressão de *ERG11* pode desempenhar um papel importante na resistência de *T. interdigitale* a ITR.

Além disso, foi verificado o aumento da expressão de *ERG11* a II e II AI expostas a ITR, sugerindo que uma breve exposição a ITR pode aumentar a expressão de *ERG11* mesmo na linhagem não exposta ao antifúngico. De modo similar, Alizadeh, Khodavandi e Zalakian (2017) notaram expressão diferencial do gene *ERG11* em linhagens de *C. albicans* resistentes após exposição ao fluconazol.

Na interação com fagócitos murinos, as linhagens II AI e II 10pl foram menos internalizadas pelos macrófagos e, conseqüentemente, menos recuperadas do seu interior. Em contrapartida, uma infecção com estas linhagens resultou em aumento da produção de ROS e PRN, espécies reativas com efetiva ação fungicida (MURRAY; WYNN, 2011; BALTAZAR *et al.*, 2014).

No intuito de verificar se a exposição ao ITR influencia na virulência de *T. interdigitale* em modelo murino, camundongos foram infectados com as diferentes linhagens. Houve menor recuperação das linhagens AI e 10pl quando comparado a seus respectivos clones não expostos aos antifúngicos.

A menor carga fúngica de II AI e II 10pl em um modelo murino pode estar associada, entre outros fatores, à menor produção de biofilme observada para II AI e II 10pl. Diversas espécies de dermatófitos são capazes de produzir biofilmes robustos e essas estruturas influenciam diretamente na interação e adesão do fungo aos tecidos do hospedeiro e, conseqüentemente, na patogênese da micose (COSTA-ORLANDI *et al.*, 2014; BRILHANTE *et al.*, 2017). Além disso, houve maior produção de ROS e PRN por macrófagos para II AI e II 10pl. Portanto, apesar de apresentar maior IPR, o aumento da produção de espécies reativas pode explicar a menor recuperação da carga fúngica na pele de camundongos infectados com II AI e II 10pl. De fato, Baltazar *et al.* (2014) demonstraram a importância da ação fagocítica e fungicida de macrófagos em camundongos infectados com *T. rubrum*, principalmente por meio da produção de ROS.

Em relação as linhagens 865 AI, 865 10pl, 917 AI e 917 10pl, foi observado que elas apresentam maior crescimento na ausência de ITR. Para 865 AI este fato é corroborado pelo aumento na velocidade de crescimento e a maior germinação dos conídios. Desta forma, apesar de as linhagens exibirem menor susceptibilidade, quando expostas a ITR, elas têm o crescimento e a germinação diminuídas.

Apesar de algumas semelhanças, estas linhagens exibem diferenças na interação com macrófagos. A fagocitose 865 AI e 10pl é diminuída, assim como ocorre com a IPR. A redução na IPR pode ser resultado do aumento da produção de compostos com atividade fungicida, como ROS e PRN, na fagocitose dessas linhagens e da menor capacidade de 865 AI crescer na presença de HP, uma espécie reativa de oxigênio. Para 917 AI, o perfil contrário foi observado. Além de apresentar maior crescimento em HP, a sua interação com macrófagos resulta em menor produção de ROS e PRN, o que pode justificar a maior IPR observada.

A produção de ROS é importante para a atividade fungicida de células fagocíticas, de modo que estes radicais estão envolvidos também na ativação do inflamassoma e na produção de IL-1 $\beta$  em sua forma ativa (DINARELLO, 2009; GROSS *et al.*, 2009; SCHRODER; TSCHOPP, 2010). Além disso, a importância da ação de macrófagos e da produção de ROS foi associada a redução da carga fúngica em modelo murino de infecção por *T. rubrum* (BALTAZAR *et al.*, 2014).

Apesar das diferenças exibidas por 865 AI e 917 AI na interação com macrófagos, ambas linhagens foram menos recuperadas da pele de camundongos infectados. Assim como observado para II AI, a exposição de 865 AI e 917 AI a ITR diminuiu a carga fúngica recuperada em modelo murino, salientando que, apesar de haver menor susceptibilidade frente a diversos antifúngicos, mudanças na fisiologia das linhagens e um perfil diferenciado na interação com macrófagos, a exposição a ITR diminuiu a capacidade de manutenção do fungo em modelo murino.

## 7 CONCLUSÃO

A exposição ao itraconazol e a terbinafina acarreta modificações no perfil de susceptibilidade de *Trichophyton*, resultando no surgimento de eventos de resistência secundária, resistência cruzada e aumento da expressão de *ERG11* em algumas linhagens. Além disso, a exposição ao itraconazol acarreta alterações fisiológicas no fungo, interação diferenciada com macrófagos e menor viabilidade do fungo em modelo murino de dermatofitose.

## **8 PERSPECTIVAS**

- Análise histopatológica dos camundongos infectados com as linhagens II, II AI, II 10pl, 865, 865 AI, 865 10pl, 917, 917 AI e 917 10pl.

## **CAPÍTULO II – O PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO DOS ANTIFÚNGICOS CLÍNICOS EM *Trichophyton interdigitale***

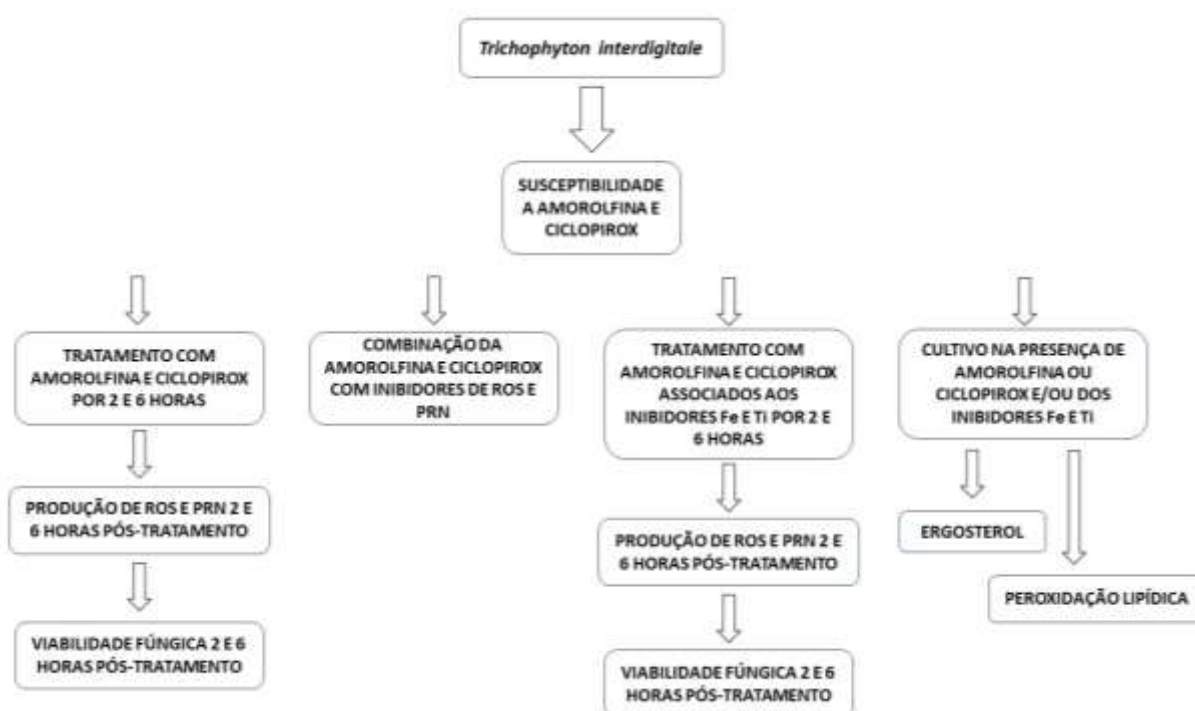
### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a susceptibilidade dos dermatófitos aos antifúngicos clínicos amorolfina e ciclopirox olamina;
- Avaliar a susceptibilidade dos dermatófitos frente ao tratamento combinado dos antifúngicos amorolfina ou ciclopirox olamina e os inibidores de ROS e PRN Tiron, FeTPPS, DETC e 3-AT;
- Analisar a produção de ROS e PRN das linhagens 2 e 6 horas pós-tratamento com amorolfina e ciclopirox olamina;
- Determinar a carga fúngica recuperada das linhagens 2 e 6 horas pós-tratamento com amorolfina e ciclopirox olamina;
- Analisar a produção de ROS e PRN das linhagens na presença dos inibidores Tiron e FeTPPS nos tempos de 2 e 6 horas pós-tratamento com amorolfina e ciclopirox olamina;
- Determinar a carga fúngica recuperada das linhagens na presença dos inibidores Tiron e FeTPPS nos tempos de 2 e 6 horas pós-tratamento com amorolfina e ciclopirox olamina.
- Avaliar o conteúdo de ergosterol e a peroxidação lipídica dos dermatófitos expostos a amorolfina e ciclopirox olamina na ausência e na presença dos inibidores Tiron e FeTPPS.

## 4 METODOLOGIA

O fluxo experimental e o resumo das metodologias empregadas no Capítulo 2 estão descritas no esquema representativo abaixo (Figura 19).

**Figura 19.** Desenho experimental do fluxograma e dos experimentos realizados no Capítulo 2 deste trabalho.



A princípio, foi avaliada a susceptibilidade de *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533, II e IV a amorolfina e ciclopirox olamina. Com base na CIM, as linhagens foram tratadas com ambos antifúngicos em concentrações subinibitórias e a produção de ROS, PRN e a viabilidade foi determinada 2 e 6 horas pós-tratamento.

Em seguida, foi avaliada a combinação entre os antifúngicos e quatro inibidores de ROS e PRN: Fe, Ti, 3-AT e DETC. A partir de então, os inibidores Fe e Ti foram associados ao tratamento com os antifúngicos e a produção de ROS, PRN e a viabilidade fúngica foi novamente determinada 2 e 6 horas pós-tratamento. Por fim, as linhagens ATCC 9533 e II foram cultivadas na presença da amorolfina ou ciclopirox na ausência e na presença dos inibidores Fe e Ti para determinação do conteúdo de ergosterol e da peroxidação lipídica.



#### 4.14 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas três linhagens de *T. interdigitale* pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG. Foi utilizada a amostra de referência *T. interdigitale* ATCC 9533 e dois isolados clínicos: *T. interdigitale* II e IV. O estoque das culturas foi mantido em Castellani (CASTELLANI, 1939) a temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Previamente a cada experimento, as linhagens foram repicadas a partir das amostras armazenadas a temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para placas de Petri contendo meio ABD.

#### 4.15 MEIOS DE CULTURA

O meio ABD foi utilizado para repique das culturas fúngicas utilizadas nos ensaios. O meio RPMI 1640 tamponado para pH 7,0 com MOPS 0,165 M sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich) foi utilizado para a determinação da CIM por microdiluição em caldo, para o ensaio de combinação de drogas e para a quantificação da produção de ROS, PRN e determinação de carga fúngica.

#### 4.16 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo fúngico e a quantificação foi determinada a partir de culturas de dermatófitos conforme item 4.3. A concentração do inóculo final foi de  $2 \times 10^4$  a  $4 \times 10^4$  conídios/mL (SANTOS; HAMDAN, 2005).

#### 4.17 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DOS DERMATÓFITOS AOS ANTIFÚNGICOS AMOROLFINA E CICLOPIROX OLAMINA POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO

A avaliação da sensibilidade dos dermatófitos frente aos antifúngicos amorolfina e ciclopirox olamina foi realizada segundo o documento M38-A2, pelo método de microdiluição em caldo proposto pelo CLSI (CLSI, 2012), com modificações.

Inicialmente, foram preparadas soluções-estoque de cada um dos antifúngicos na concentração de  $2000\text{ }\mu\text{g/mL}$  em DMSO. Posteriormente, as

soluções-estoque dos antifúngicos foram diluídas em meio RPMI 1640. Por meio de diluições seriadas, foram obtidas concentrações que variaram de 0,03 a 16 µg/mL para ambos os antifúngicos. Na sequência, alíquotas de 100 µl de cada diluição e 100 µL do inóculo das três linhagens foram dispensados em cada um dos poços de uma placa de microdiluição de 96 poços. Posteriormente, as placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias (CLSI, 2012).

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. A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento fúngico (CLSI, 2012). O experimento foi realizado em duplicata técnica e biológica.

#### 4.18 TESTE DA ATIVIDADE DOS ANTIFÚNGICOS AMOROLFINA E CICLOPIROX EM COMBINAÇÃO COM INIBIDORES DE ROS OU PRN

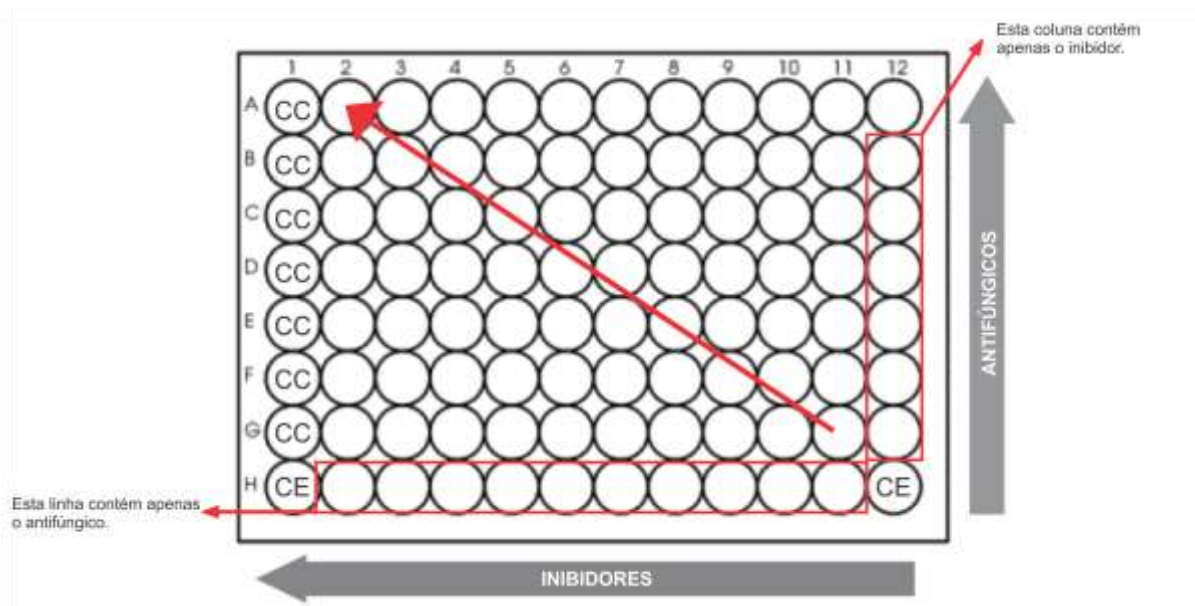
Os antifúngicos foram testados quanto a sua atividade em combinação com quatro compostos: sal dissódico do ácido 4,5-di-hidroxi-1,3-benzenodissulfônico monohidratado (Tiron, Ti, Sigma-Aldrich), um sequestrador de íons superóxido; 5,10,15,20-tetraquis(4-sulfonatofenil) porfirinato de ferro (III) (FeTPPS, Fe, Sigma-Aldrich) um sequestrador de íons peroxinitrito; dietilditiocarbamato de sódio tri-hidratado (DETC, De, Sigma-Aldrich), um inibidor da enzima superóxido dismutase (SOD); e 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT, Sigma-Aldrich), um inibidor da enzima peroxidase (PER). Sete diluições seriadas de cada inibidor e dez diluições dos antifúngicos foram preparadas utilizando o RPMI 1640 (BALTAZAR *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2013).

As concentrações dos antifúngicos variaram entre 2,00 e 0,03 µg/mL para amorolfina e de 8,00 a 0,12 µg/mL para ciclopirox olamina. Já as concentrações dos inibidores variaram entre 2,000 e 0,001 mM para DETC; 10,000 e 0,009 µM para FeTPPS; 20,00 e 0,01 mM para 3-AT, e 500,00 e 0,04 µM para Tiron.

Alíquotas de 50 µL de cada diluição dos inibidores foram adicionadas aos orifícios de uma placa de 96 poços na orientação horizontal e as alíquotas de 50 µL de cada diluição dos antifúngicos na orientação vertical, de modo que a placa contivesse várias combinações de concentrações dos inibidores e do antifúngico (Figura 20) (SHIN; LIM, 2004). Após as diluições, foram adicionados 100 µL do

inóculo em cada poço, preparado conforme descrito no item 4.3 e as placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias.

**Figura 20.** Esquema do teste de combinação de drogas. As setas indicam o aumento da concentração de cada agente individualmente e a seta em diagonal indica o aumento da concentração de antifúngico e do inibidor em combinação. CC = controle de crescimento; CE = controle de esterilidade.



Fonte: O autor (2021).

A leitura dos valores de CIM para cada agente individualmente e em combinação foi determinada visualmente, considerando-se 100% de inibição do crescimento. Na leitura, com a determinação da CIM para o inibidor, esse ponto foi fixado e foi determinada a CIM do antifúngico em cada concentração testada. Deste modo, a interação dos inibidores com cada antifúngico foi expressa pelo índice da concentração inibitória fracionária (ICIF), que é a soma do valor médio de concentração inibitória fracionária (CIF) de cada agente.

A CIF de cada agente foi calculada como a CIM desse agente em combinação dividido pela CIM do agente sozinho:

$$ICIF = CIFA + CIFB = \frac{C_A^{comb}}{CIM_A^{individual}} + \frac{C_B^{comb}}{CIM_B^{individual}}$$

Onde  $CIM_A^{individual}$  e  $CIM_B^{individual}$  são as CIMs dos antifúngicos ou dos inibidores quando agindo sozinhos e  $C_A^{comb}$  e  $C_B^{comb}$  em combinação. Os resultados foram interpretados como sinergismo quando foi obtido valor  $\leq 1,0$ ; indiferente quando o valor foi  $1 < ICIF < 4$  e antagonismo quando o ICIF foi  $> 4,0$  (GOMEZ-LOPEZ *et al.*, 2003; SHIN; LIM, 2004; SOARES *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2010).

#### 4.19 PRODUÇÃO DE ROS E PRN NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DOS INIBIDORES E RECUPERAÇÃO DE CARGA FÚNGICA

As linhagens de *T. interdigitale* foram submetidas aos antifúngicos amorolfina (AMO) e ciclopirox olamina (CIC) em concentrações subinibitórias (1/2 MIC) na presença e na ausência dos inibidores Tiron (Ti; 10 mM) e FeTPPS (Fe; 10  $\mu$ M).

Para tanto, foram designados os seguintes grupos: i) fungo; ii) fungo + AMO; iii) fungo + AMO + Ti; iv) fungo + AMO + Fe; v) fungo + CIC; vi) fungo + CIC + Ti; vii) fungo + CIC + Fe. Os controles de indução de produção de ROS e PRN foram peróxido de hidrogênio (HP, 2 mM) e cloridrato de 3-morfolinossodnonimina (SIN-1, 1 mM), respectivamente.

Deste modo, os fungos foram expostos ao tratamento *in vitro* na ausência ou presença dos inibidores para determinação da quantidade endógena de ROS e PRN (SOARES *et al.*, 2011). Assim, a suspensão de conídios foi incubada com DCFH-DA e DHR 123 para dosagem de ROS e PRN, respectivamente. A fluorescência foi mensurada nos tempos de 2 e 6 horas pós-tratamento em fluorímetro (Synergy 2 SL Luminescence Microplate Reader; Biotek), utilizando comprimentos de onda de excitação e de emissão de 500 nm (SANTOS *et al.*, 2014). Os dados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (UA).

Além disso, o conteúdo dos poços foi plaqueado em meio ABD e as placas foram incubadas a 28 °C por 72 horas para determinação a viabilidade fúngica pós-tratamento (UFC/mL).

#### 4.20 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO DE ERGOSTEROL E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Previamente a este ensaio, as linhagens de *T. interdigitale* 9533 e II foram crescidas em ABD suplementado com os antifúngicos e os inibidores nas diferentes

condições experimentais: AMO (0,12 (µg/mL), AMO + Fe (10 µM), AMO + Ti (10 mM), CIC (1,00 µg/mL), CIC + Fe (10 µM) e CIC + Ti (10 mM). A linhagem *T. interdigitale* IV foi excluída desta análise devido aos resultados observados na viabilidade fúngica diante do tratamento com os inibidores Fe e Ti combinado aos antifúngicos.

Após adição de  $10^6$  conídios de cada linhagem a seu respectivo grupo, as placas foram incubadas a 28 °C por 14 dias ao abrigo de luz. Em seguida, a quantificação de ergosterol e da peroxidação lipídica ocorreu conforme descrito nos itens 4.8.8. e 4.8.9, respectivamente.

#### 4.21 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por meio do Software *Prism 6* (*GraphPad Inc.*, San Diego, CA, USA) utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.12 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) POR MEIO DO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

As CIMs dos antifúngicos amorolfina e ciclopirox olamina para as linhagens de *T. interdigitale* ATCC 9533, II e IV estão descritas na Tabela 10.

**Tabela 10.** Concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos clínicos amorolfina e ciclopirox olamina para as linhagens de *T. interdigitale* ATCC 9533, II e IV, determinada pelo método de microdiluição em caldo.

| Linhagem | CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) |            |
|----------|--------------------------|------------|
|          | Amorolfina               | Ciclopirox |
| 9533     | 0,25                     | 2,00       |
| II       | 0,25                     | 2,00       |
| IV       | 0,25                     | 2,00       |

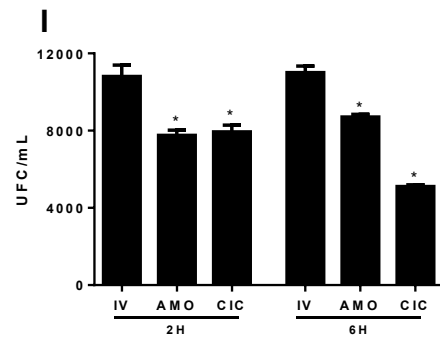
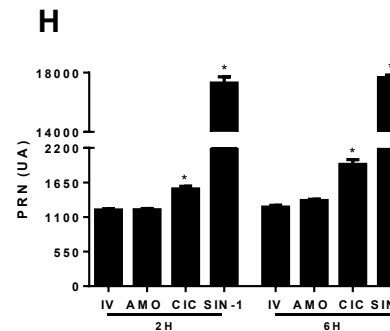
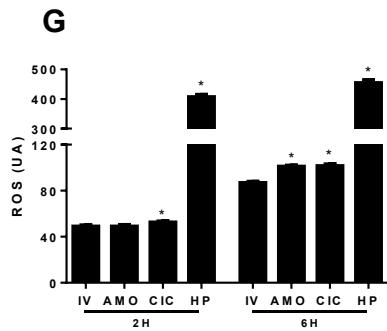
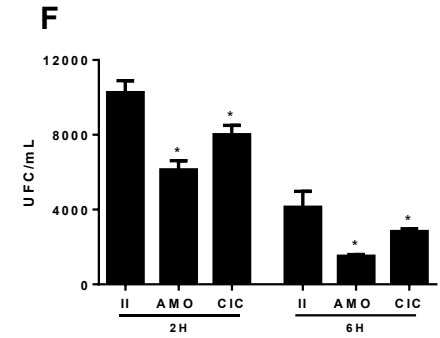
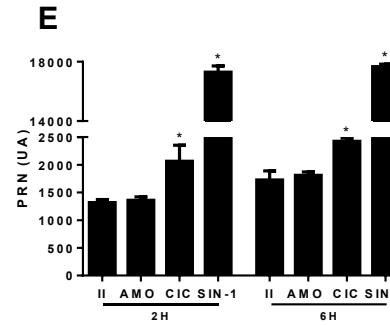
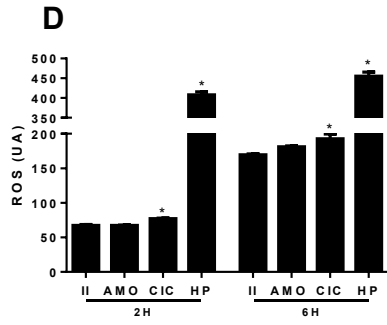
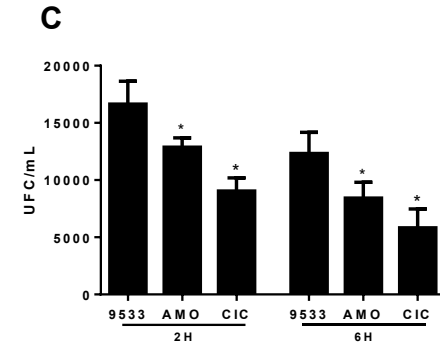
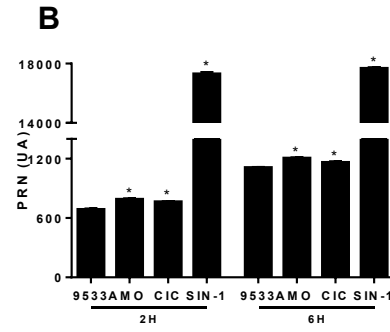
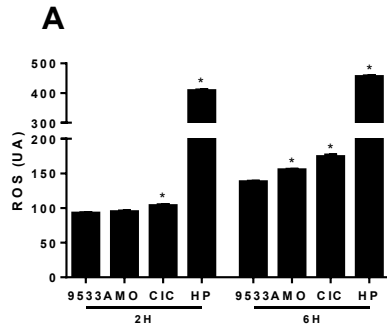
A CIM foi de 0,25  $\mu\text{g/mL}$  para amorolfina e de 2,00  $\mu\text{g/mL}$  para ciclopirox olamina frente as três linhagens de *T. interdigitale* testadas (Tabela 10).

### 5.13 EFEITO *in vitro* DA AMOROLFINA E DO CICLOPIROX OLAMINA NA PRODUÇÃO DE ROS, PRN E VIABILIDADE CELULAR DE *T. interdigitale*

A produção de ROS, PRN e a viabilidade celular pós-tratamento com ambos os antifúngicos está sumarizada na Figura 21.

**Figura 21. Efeito *in vitro* dos antifúngicos na produção de ROS, PRN e viabilidade celular.** Produção de ROS, PRN e viabilidade celular pós-tratamento com amorolfina (AMO) e ciclopirox olamina (CIC) nos tempos de 2 e 6 horas para as linhagens (A, B, C) *T. interdigitale* ATCC 9533, (D, E, F) II e (G, H e I) IV. HP: peróxido de hidrogênio; SIN-1: cloridrato de 3-morfolinossodnonimina.

\* Diferença significativa em relação ao fungo sem tratamento (9533, II ou IV).



Para a linhagem 9533, a produção de ROS em AMO foi maior no tempo de 6 horas. Em relação a PRN, a produção foi elevada em ambos os tempos após contato com AMO. Para CIC, a produção de ROS e PRN foi significativamente maior em ambos os tempos (Figura 21.A e 21.B). A recuperação de carga fúngica, por sua vez, foi menor diante do tratamento com AMO e CIC em ambos os tempos (Figura 21.C).

No que diz respeito a linhagem II, houve maior produção de ROS e PRN para CIC em ambos os tempos (Figura 21.D e 21.E). A recuperação de carga fúngica, por sua vez, foi menor em ambos os tempos e tratamentos (Figura 21.F).

Já para a linhagem IV, a produção de ROS e PRN foi aumentada em CIC em ambos os tempos (Figura 21.G e 21.H). Para AMO, houve aumento da produção de ROS no tempo de 6 horas (Figura 21.G). A carga fúngica foi menor no tratamento com AMO e CIC nos tempos de 2 e 6 horas (Figura 21.I).

#### 5.14 AVALIAÇÃO DA AÇÃO COMBINADA ENTRE ANTIFUNGICOS E INIBIDORES DE RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO

Os ICIFs resultantes da combinação entre os inibidores de resposta ao estresse oxidativo e os antifúngicos e natureza desta combinação estão sumarizados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Índice da concentração inibitória fracionária (ICIF) e natureza da interação entre os inibidores e os antifúngicos.

| Linhagem    | AMO            |               |               |               | CIC            |               |               |               |
|-------------|----------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
|             | De             | Fe            | 3AT           | Ti            | De             | Fe            | 3AT           | Ti            |
|             | ICIF           |               |               |               |                |               |               |               |
| <b>9533</b> | 9,27<br>(ANT)  | 1,28<br>(IND) | 1,21<br>(IND) | 1,14<br>(IND) | 18,22<br>(ANT) | 1,28<br>(IND) | 1,14<br>(IND) | 1,06<br>(IND) |
| <b>II</b>   | 9,20<br>(ANT)  | 0,78<br>(SIN) | 0,99<br>(SIN) | 0,71<br>(SIN) | 18,22<br>(ANT) | 2,99<br>(IND) | 1,14<br>(IND) | 1,01<br>(IND) |
| <b>IV</b>   | 18,23<br>(ANT) | 1,28<br>(IND) | 0,59<br>(SIN) | 1,14<br>(IND) | 18,22<br>(ANT) | 2,71<br>(IND) | 1,42<br>(IND) | 1,03<br>(IND) |

AMO: amorolfina; CIC: ciclopirox olamina; De: DETC; Fe: FeTPPS; Ti: Tiron.

SIN, sinergismo (ICIF < 1); IND, indiferente (1 < ICIF < 4); ANT, antagonismo (ICIF > 4).

A combinação entre De e AMO ou CIC foi antagônica para todas as linhagens. Houve sinergismo entre AMO e Fe, AMO e 3AT e AMO e Ti para a



linhagem II. Além disso, a combinação entre AMO e 3AT apresentou sinergismo em relação a linhagem IV. Todas as outras interações testadas foram consideradas indiferentes (Tabela 11).

#### 5.15 EFEITO *in vitro* DO TRATAMENTO COMBINADO DE AMOROLFINA E CICLOPIROX OLAMINA COM INIBIDORES DE ROS E PRN NA PRODUÇÃO DE ROS, PRN E VIABILIDADE CELULAR

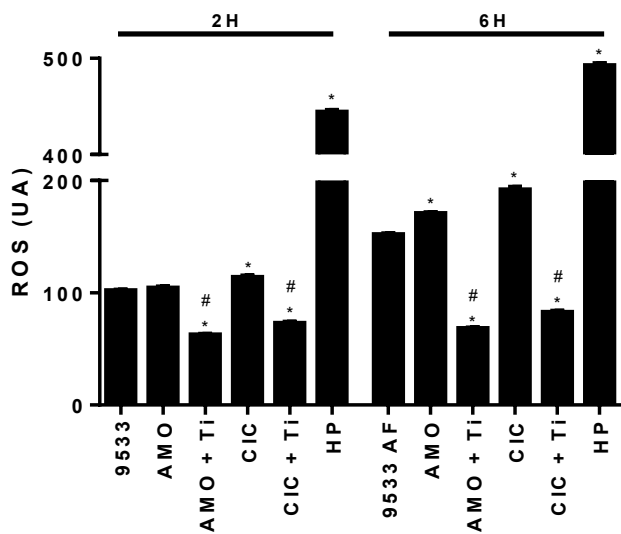
A produção de ROS, PRN e a carga fúngica recuperada pós-tratamento foi quantificada nos tempos de 2 e 6 horas. Os resultados para a linhagem *T. interdigitale* ATCC 9533 estão descritos na Figura 22.

**Figura 22. Efeito *in vitro* dos antifúngicos e inibidores do estresse oxidativo e nitrosativo na produção de ROS, PRN e viabilidade celular.** Produção de (A) ROS, (B) PRN e (C) carga fúngica recuperada pós-tratamento *in vitro* com amorolfina (AMO) e ciclopirox olamina (CIC) na ausência e na presença dos inibidores Tiron (Ti) e FETPPS (Fe) nos tempos de 2 e 6 horas para a linhagem *T. interdigitale* ATCC 9533.

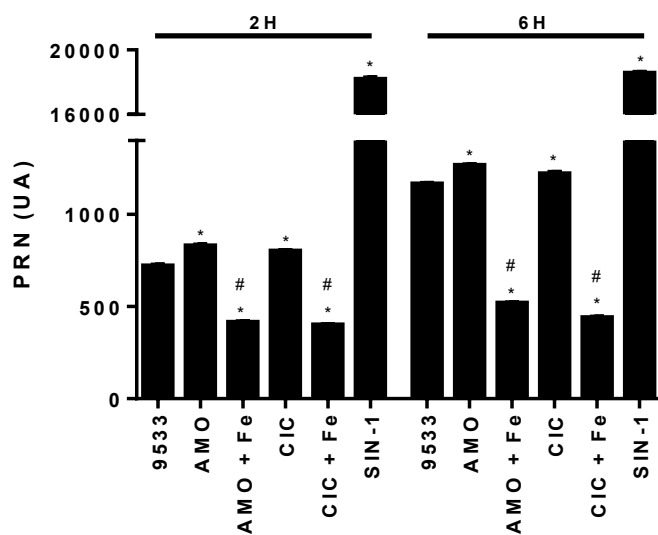
\* Diferença significativa em relação a linhagem 9533 sem tratamento.

# Diferença significativa em relação ao fungo tratado na ausência do inibidor.

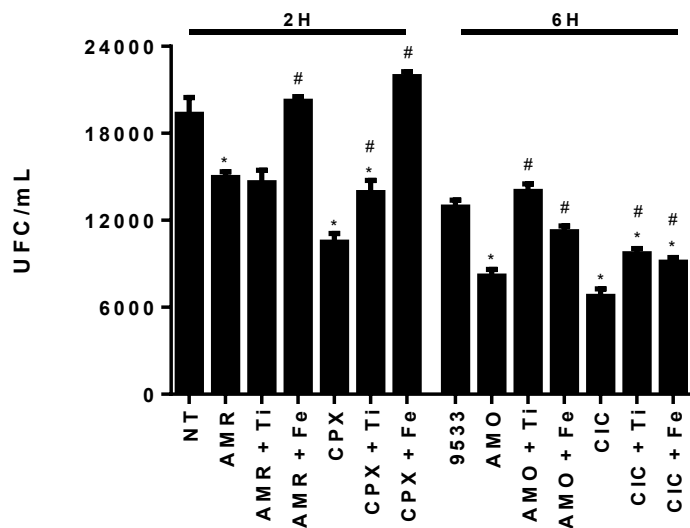
**A**



**B**



**C**

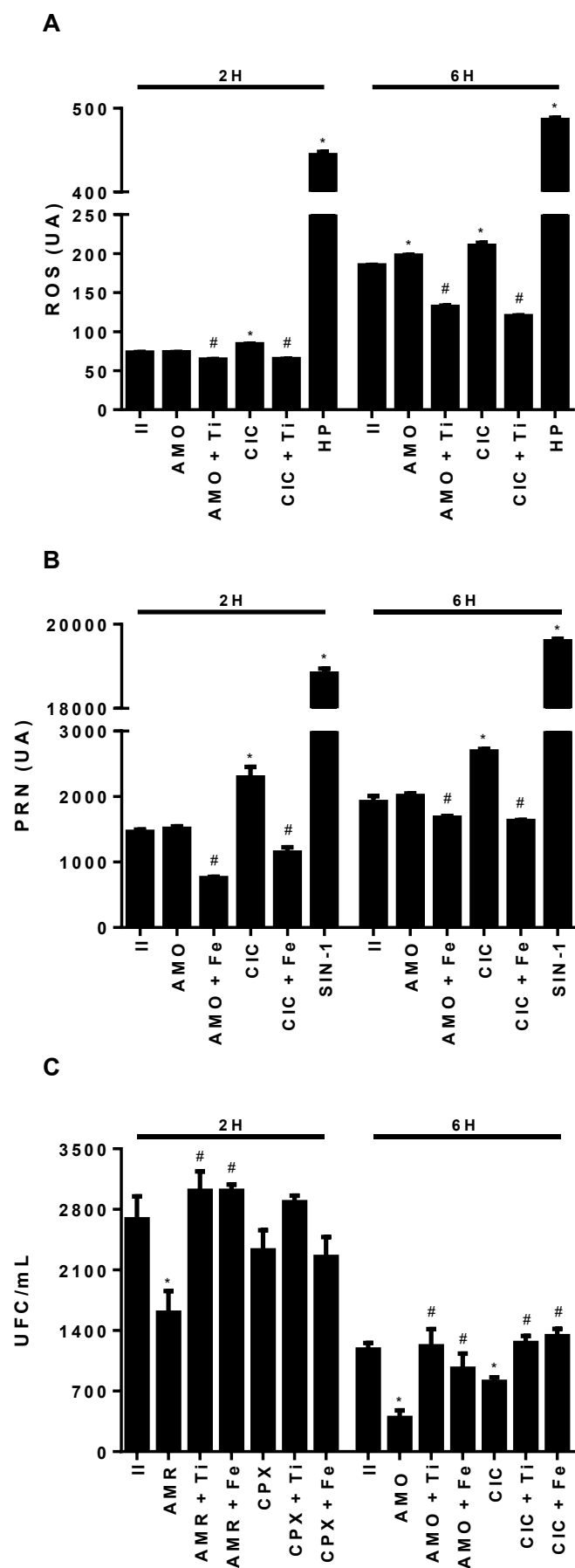


O uso de inibidores minimizou a produção de ROS e PRN para AMO e CIC em ambos os tempos (Figura 22.A e 22.B). Em contrapartida, a recuperação de carga fúngica para AMO foi aumentada na presença Fe em 2 e 6 horas e de Ti no tempo de 6 horas. Já quando tratado com CIC, houve aumento da recuperação fúngica na presença de Ti e Fe em ambos os tempos (Figura 22.C). Os dados referentes a linhagem *T. interdigitale* II estão na Figura 23.

**Figura 23. Efeito *in vitro* dos antifúngicos e inibidores do estresse oxidativo e nitrosativo na produção de ROS, PRN e viabilidade celular.** Produção de (A) ROS, (B) PRN e (C) carga fúngica recuperada pós-tratamento *in vitro* com amorolfina (AMO) e ciclopirox olamina (CIC) na ausência e na presença dos inibidores Tiron (Ti) e FETPPS (Fe) nos tempos de 2 e 6 horas para a linhagem *T. interdigitale* II.

\* Diferença significativa em relação a linhagem II sem tratamento.

# Diferença significativa em relação ao fungo tratado na ausência do inibidor.

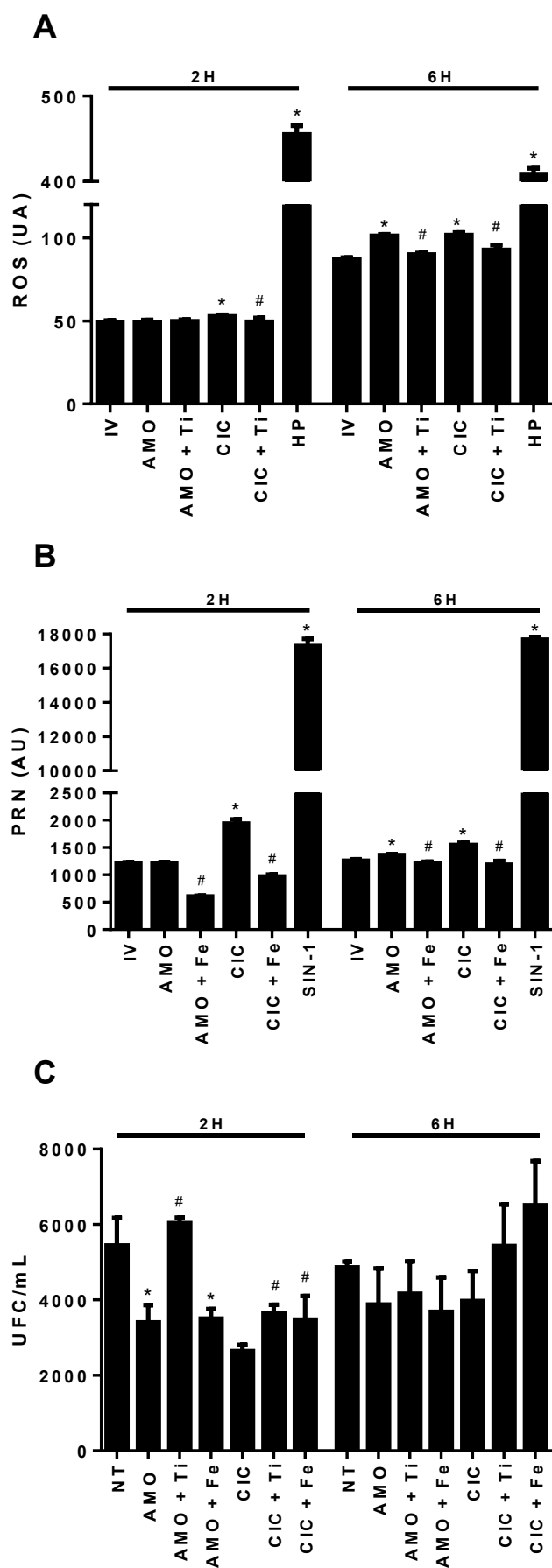


Os inibidores minimizaram a produção de ROS e PRN em ambos os tempos (Figura 23.A e 23.B). Em contrapartida, a carga fúngica foi aumentada na presença de ambos os inibidores associados a AMO nos tempos de 2 horas e de 6 horas. Para CIC, houve aumento da carga fúngica na associação com Fe e Ti no tempo de 6 horas (Figura 23.C). Os dados referentes a linhagem *T. interdigitale* IV estão na Figura 24.

**Figura 24. Efeito *in vitro* dos antifúngicos e inibidores do estresse oxidativo e nitrosativo na produção de ROS, PRN e viabilidade celular.** Produção de (A) ROS, (B) PRN e (C) carga fúngica recuperada pós-tratamento *in vitro* com amorolfina (AMO) e ciclopirox olamina (CIC) na ausência e na presença dos inibidores Tiron (Ti) e FETPPS (Fe) nos tempos de 2 e 6 horas para a linhagem *T. interdigitale* IV.

\* Diferença significativa em relação a linhagem IV sem tratamento.

# Diferença significativa em relação ao fungo tratado na ausência do inibidor.



A produção de ROS foi diminuída na associação CIC + Ti no tempo de 2 horas e na combinação de Ti com CIC e AMO no tempo de 6 horas (Figura 24.A). Já a produção de PRN foi diminuída no uso de Fe e Ti associado a CIC e AMO em ambos os tempos (Figura 24.B). A recuperação de carga fúngica no tempo de 2 horas foi maior para AMO e CIC associados a Ti e para CIC associado a Fe (Figura 24.C).

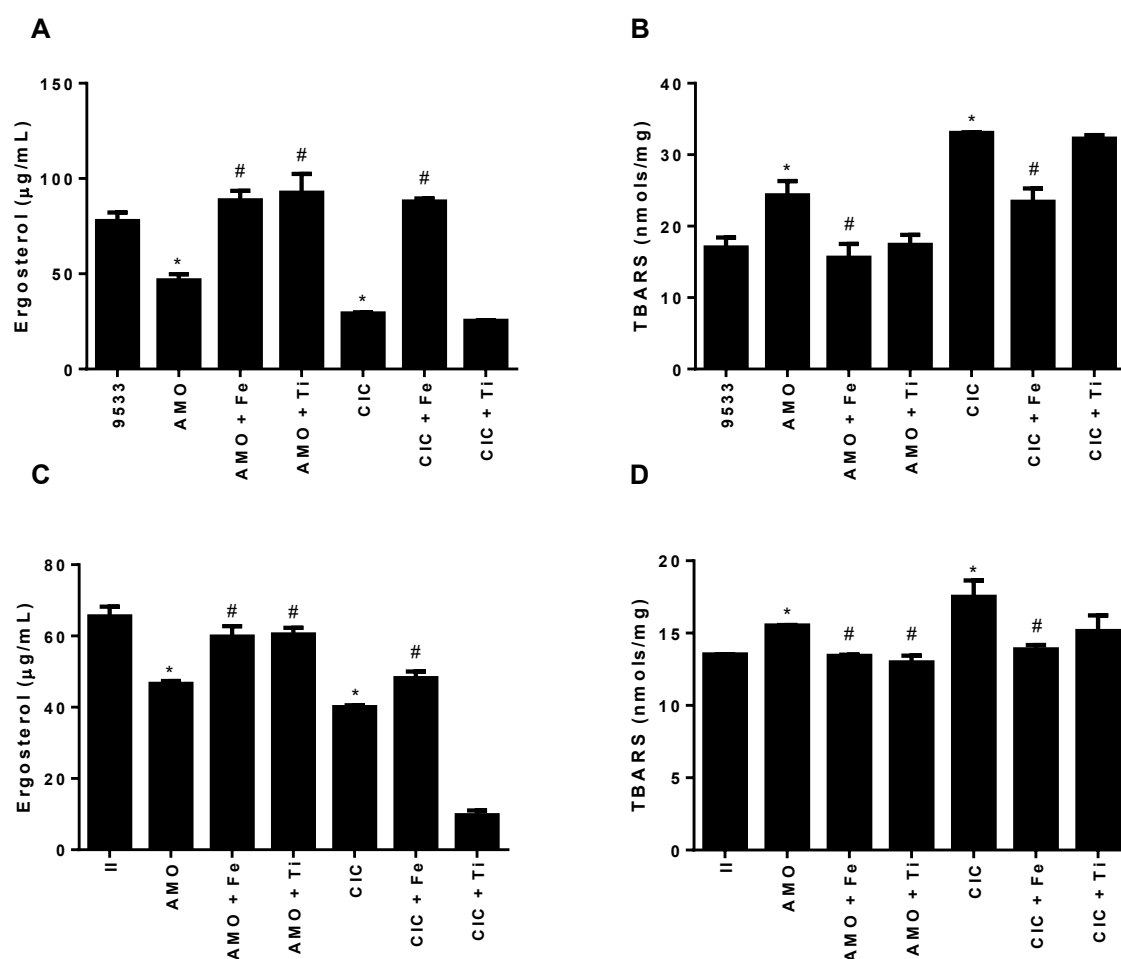
#### 5.16 EFEITO *in vitro* DO TRATAMENTO COMBINADO DE AMOROLFINA E CICLOPIROX OLAMINA COM INIBIDORES DE ROS E PRN NO CONTÉUDO DE ERGOSTEROL E NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Nesta etapa, avaliamos o conteúdo de ergosterol e a peroxidação lipídica apenas para as linhagens *T. interdigitale* 9533 e II (Figura 25).

**Figura 25. Efeito *in vitro* dos antifúngicos e inibidores do estresse oxidativo e nitrosativo no conteúdo de ergosterol e na peroxidação lipídica.** Conteúdo de ergosterol de (A) *T. interdigitale* 9533 e (C) II e peroxidação lipídica de (B) *T. interdigitale* 9533 e (D) II pós-tratamento *in vitro* com amorolfina (AMO) e ciclopirox olamina (CIC) na ausência e na presença dos inibidores Tiron (Ti) e FETPPS (Fe).

\* Diferença significativa em relação a respectiva linhagem sem tratamento.

# Diferença significativa em relação ao fungo tratado na ausência do inibidor.



O tratamento com AMO e CIC reduziu o conteúdo de ergosterol de *T. interdigitale* 9533 e II (Figuras 25.A e C). Para a linhagem 9533, a associação CIC + Fe, AMO + Fe e CIC + Ti resultaram em aumento do conteúdo de ergosterol quando comparado a linhagem exposta somente aos antifúngicos (Figura 25.A). Houve aumento da peroxidação lipídica para 9533 tratada com AMO e CIC e, em contrapartida, a associação com Fe reduziu a peroxidação lipídica para ambos os antifúngicos (Figura 25.B).

Para a linhagem *T. interdigitale* II, a adição de Fe a CIC aumentou o conteúdo de ergosterol (Figura 25.C) e reduziu a peroxidação lipídica (Figura 25.D). A associação de Fe e Ti a AMO também resultou em diminuição da peroxidação lipídica quando comparado apenas a linhagem tratada com AMO (Figura 25.D).



## 6 DISCUSSÃO

Neste capítulo, foi avaliado o estresse oxidativo e nitrosativo causado pela amorolfina e ciclopirox olamina, antifúngicos utilizados em um tipo de dermatofitose que acomete as unhas: a onicomicose. Estima-se que a onicomicose afete cerca de 13% da população mundial e 25% da população geriátrica (GHANNOUM; ISHAM, 2014; GUPTA; VERSTEEG; SHEAR, 2017), com maior prevalência em indivíduos com obesidade, diabetes, imunodeficiência e outros fatores de risco (ELEWSKI; TOSTI, 2015; GARCÍA-ROMERO; LOPEZ-AGUILAR; ARENAS, 2014; SIGURGEIRSSON; STEINGRÍMSSON, 2004). No presente estudo, avaliamos a ação dos antifúngicos contra *Trichophyton interdigitale*, um dos principais agentes causadores de onicomicose em humanos (HAGHANI *et al.*, 2013).

A amorolfina (AMO) é uma droga que atua na biossíntese de ergosterol por meio da inibição das enzimas esterol-14- $\Delta$  redutase e esterol- $\Delta$ 7- $\Delta$ 8 isomerase (BANERJEE *et al.*, 2011). *T. interdigitale* 9533, II e IV foram susceptíveis a AMO em valores de CIM similares ao de outros estudos (SCHALLER *et al.*, 2009; SHAW *et al.*, 2020); de modo que o tratamento com este antifúngico aumentou a produção de ROS e PRN e reduziu a viabilidade das três linhagens de *T. interdigitale* após 6 horas de tratamento.

As ROS se caracterizam por radicais do tipo superóxido, oxigênio singleto, hidroxila e peróxido de hidrogênio que tem a capacidade de reagir com diferentes componentes celulares, resultando em danos e disfunção de proteínas estruturais, enzimas e ácidos nucleicos (SMIJS *et al.*, 2009). Já o peroxinitrito, apesar de não possui elétron desemparelhado, é um poderoso oxidante cuja ação pode resultar em diversos efeitos prejudiciais as células, como peroxidação lipídica e inativação de algumas enzimas (VIRÁG *et al.*, 2003; SZABÓ; ISCHIROPOULOS; RADI, 2007).

No intuito de avaliar se ROS e PRN eram fundamentais na redução da carga fúngica pós-tratamento, nós associamos dois inibidores a AMO. O Tiron (Ti) é um sequestrador de íons superóxido envolvido, portanto, diretamente na produção de ROS; e o FeTPPS (Fe) um sequestrador de íons peroxinitrito, relacionado a produção de PRN.

A adição de Fe e Ti a AMO reduziu a produção de ROS e PRN para as três linhagens de *T. interdigitale*. Diante da adição dos inibidores, houve aumento da carga fúngica de *T. interdigitale* 9533 e II no tempo de 6 horas pós-tratamento. O

estresse oxidativo associado a produção de ROS é um dos indicativos de morte celular. As ROS reagem imediatamente com lipídios insaturados, o que pode resultar em aumento da fluidez da membrana celular (KHAN *et al.*, 2011), caracterizando um processo de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é resultado da degradação oxidativa de lipídios, de forma que uma cadeia de radicais livres sequestra elétrons dos lipídios nas membranas celulares resultando em danos às células (FERREIRA *et al.*, 2013) e, conseqüente, menor viabilidade fúngica. Em conjunto, ROS e PRN podem causar um desequilíbrio na homeostase celular, levando a danos em organelas e ácido nucleicos (MROZ *et al.*, 2011).

Desta forma, hipotetizamos se AMO possui outro mecanismo de ação paralelo à inibição de enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol. Para tanto, avaliamos o conteúdo de ergosterol e a peroxidação lipídica das linhagens *T. interdigitale* 9533 e II cultivadas em condições de exposição aos antifúngicos e aos inibidores.

O tratamento com AMO reduziu o conteúdo de ergosterol de *T. interdigitale* 9533 e II. Entretanto, houve aumento do ergosterol na associação de AMO com Ti e Fe. Altos níveis de TBARSs foram observados no tratamento com AMO, sendo este perfil revertido após a adição de Fe. Em conjunto, estes dados indicam que AMO facilita a peroxidação lipídica de duas maneiras: inibindo a biossíntese de ergosterol e induzindo estresse oxidativo, o que torna a membrana celular altamente permeável e pode levar a morte de *T. interdigitale*.

Frente a estes resultados, buscamos avaliar se os mesmos mecanismos ocorrem no tratamento com ciclopirox olamina (CIC). CIC atua em vários processos metabólicos da célula fúngica, principalmente na função mitocondrial, inibição de enzimas dependentes de metais e afetando a permeabilidade da membrana (SONTHALIA; AGRAWAL; SEHGAL, 2019; SUBISSI *et al.*, 2010).

CIC exibiu atividade antifúngica contra *T. interdigitale* 9533, II e IV em valores de CIM condizentes com outros estudos (BALTAZAR *et al.*, 2013; SHAW *et al.*, 2020). Além disso, o tratamento com este antifúngico acarretou aumento da produção de ROS e PRN associado a redução da viabilidade fúngica 6 horas pós-tratamento. Estes dados vão ao encontro do que foi observado anteriormente para *T. rubrum*. Baltazar *et al.* (2013) demonstraram que o aumento a produção de ROS, PRN e óxido nítrico pós-tratamento com ciclopirox associado a terapia fotodinâmica foi fundamental para atividade antimicrobiana da terapia proposta.

De modo similar ao observado para AMO, a adição de Ti e Fe reduziu a produção de ROS e PRN, resultando em aumento da viabilidade fúngica de *T. interdigitale* 9533 e II no tempo de 6 horas após tratamento. Desta forma, fica estabelecida que a adição de inibidores de íons superóxido e peroxinitrito prejudica a produção de ROS e PRN e, conseqüentemente, compromete a eficiência do tratamento. Dados similares foram observados em estudos com *C. albicans* (CARVALHO; FELIPE; COSTA, 2009) e *T. rubrum* (BALTAZAR *et al.*, 2013). Associada a redução de ergosterol de *T. interdigitale* 9533 e II, houve aumento da peroxidação lipídica. Entretanto, a peroxidação lipídica foi minimizada após adição de Fe a CIC.

Em ambos os antifúngicos, a produção de ROS e PRN se eleva em tempos curtos, demonstrando que o estresse oxidativo e nitrosativo pode ter um efeito antifúngico importante, principalmente no início do tratamento. É importante considerar que o sistema antioxidante fúngico é capaz de responder ao estresse produzido por estes compostos, neutralizando ou minimizando ROS e PRN (BROWN; HAYNES; QUINN, 2009; FERREIRA *et al.*, 2013). Esse fato é reforçado pelas relações observadas por meio do ensaio de combinação. Em alguns casos, houve indiferença, o que pode explicar que houve neutralização de ROS e PRN a longo prazo. Para algumas condições, houve antagonismo, indicando que a associação com os inibidores levam a aumento da carga fúngica mesmo em períodos prologados (7 dias de tratamento). No caso do sinergismo, pode ser que a combinação tenha resultado em aumento das enzimas do sistema antioxidante, potencializando a neutralização de ROS e PRN. Entretanto, é importante salientar que essas interações tiveram perfis linhagem-dependente.

Em conjunto, estes dados demonstram a importância que o estresse oxidativo e nitrosativo têm na ação de AMO e CIC contra linhagens de *T. interdigitale*, elucidando, possivelmente, um mecanismo de ação secundário aqueles já descritos e estabelecidos. Baltazar *et al.* (2015) demonstraram o papel do aumento da produção de ROS e PRN na morte de *T. rubrum* por meio de terapia fotodinâmica associada a nanopartículas de curcumina, reforçando a ação antidermatofítica de ROS e PRN. Assim, estas informações tornam-se fundamentais para o melhor entendimento do mecanismo de ação de AMO e CIC e abre a possibilidade de compreender como os processos de linhagens de dermatófitos resistentes pode ocorrer. Além disso, é bem estabelecido que a produção de ROS e PRN tem papel

importante na ação de células fagocíticas que pode resultar em morte por apoptose, necrose ou autofagia (MROZ *et al.*, 2011), o que reforça a importância que estas interações podem ter em modelos celulares.

## 7 CONCLUSÃO

Os antifúngicos amorolfina e ciclopirox olamina exercem ação antidermatofítica por mecanismo de ação que envolve a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

## REFERÊNCIAS

- ABOUL-ELLA, H., HAMED, R., ABO-ELYAZEED, H. Recent trends in rapid diagnostic techniques for dermatophytosis. **Int J Vet Sci Med**, v. 8, n. 1: p. 115-123, 2020.
- ACHTERMAN, R. R., SMITH, A. R., OLIVER, B. G. *et al.* Sequenced dermatophyte strains: growth rate, conidiation, drug susceptibilities, and virulence in an invertebrate model. **Fungal Genet Biol**, v. 48, n. 3: p. 335–341, 2011.
- ALEMAYEHU, A., MINWUYELET, G., ANDUALEM, G. Prevalence and Etiologic Agents of Dermatophytosis among Primary School Children in Harari Regional State, Ethiopia. **Journal of Mycology**, p. 1-5, 2016.
- ALIZADEH, F., KHODAVANDI, A., ZALAKIAN, S. Quantitation of ergosterol content and gene expression profile of ERG11 gene in fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Curr Med Mycol**, v. 3: p. 13–19, 2017.
- AMEEN, M. Epidemiology of superficial fungal infections. **Clin Dermatol**, v. 28: p. 197-201, 2010.
- ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. **J Ant Chem**, v. 44: p. 151-162, 1999.
- ANSARI, S., HEDAYATI, M. T., ZOMORODIAN, K. *et al.* Molecular characterization and *in vitro* antifungal susceptibility of 316 clinical isolates of dermatophytes in Iran. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1, p. 89-95, 2016.
- ARRESE, J. E., PIERARD-FRANCHIMONT, C., PIERARD, G. E. A plea to bridge the gap between antifungals and the management of onychomycosis. **Am. J. Clin. Dermatol**, v. 2: p. 281–284, 2001.
- 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.
- ARVANITIS, M., ANAGNOSTOU, T., FUCHS, B. B. *et al.* Molecular and Nonmolecular Diagnostic Methods for Invasive Fungal Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3: p. 490 –526, 2014.
- AZAMBUJA, C. V. A., PIMMEL, L. A., KLAFKE, G. B. *et al.* Onychomycosis: clinical, mycological and *in vitro* susceptibility testing of isolates of *Trichophyton rubrum*. **An Bras Dermatol**, v. 89, n. 4: p. 581-6, 2014.
- BABU, P. R., PRAVIN, A. J. S., DESHMUKH, G. *et al.* Efficacy and Safety of Terbinafine 500 mg Once Daily in Patients with Dermatophytosis. **Indian J Dermatol**. v. 62, n. 4: p. 395-399, 2017.

- BALDO, A., TABART, J., VERMOUT, S. *et al.* Secreted subtilisins of *Microsporium canis* are involved in adherence of arthroconidia to feline corneocytes. **J. Med. Microbiol.** v. 57: p. 1152-6, 2008.
- BALDO, A., MONOD, M., MATHY, A. *et al.* Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. **Mycoses**, v. 55, n. 3: p. 218-23, 2012.
- BALTAZAR, L. M., SANTOS, P. C., PAULA, T. P. *et al.* IFN- $\gamma$  impairs *Trichophyton rubrum* proliferation in a murine model of dermatophytosis through the production of IL-1 $\beta$  and reactive oxygen species. **Medical Mycology**, v. 52: p. 293–302, 2014.
- BALTAZAR, L. M., SOARES, B. M., CARNEIRO, H. C. S. *et al.* Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum*: *in vitro* activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death. **J Antimicrob Chemother**, v. 68: p. 354–361, 2013.
- BALTAZAR, L. M., WERNECK, S. M. C., CARNEIRO, H. C. S. *et al.* Photodynamic therapy efficiently controls dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* in a murine model. **Br J Dermatol**, v. 172, n. 3: p. 801-4, 2015.
- BALTAZAR, L. M., KRAUSZ, A. E., SOUZA, A. C. O. *et al.* *Trichophyton rubrum* is Inhibited by Free and Nanoparticle Encapsulated Curcumin by Induction of Nitrosative Stress after Photodynamic Activation. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3: 2015.
- BANERJEE, M., GHOSH, A. S., BASAK, S. *et al.* Comparative evaluation of effectivity and safety of topical amorolfine and clotrimazole in the treatment of tinea corporis. **Indian journal of dermatology**, v. 56, n. 6, p. 657–662, 2011.
- BARROS, M. E. S., SANTOS, D. A., HAMDAN, J. S. Evaluation of susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). **Journal of Medical Microbiology**, v. 56: p. 514–518, 2007.
- BASTOS, R. W., CARNEIRO, H. C. S., OLIVEIRA, L. V. N. *et al.* Environmental triazole induces crossresistance to clinical drugs and affects morphophysiology and virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, 2018.
- BECKHEINRICH, P., NENOFF, P., RYTTER, M. *et al.* Tinea corporis und Kerion Celsi des Mons pubis durch *Trichophyton mentagrophytes*. **Akt Dermatol**, v. 27: p. 37–41, 2001.
- BELLMANN, R. Clinical pharmacokinetics of systemically administered anti-mycotics. **Curr Clin Pharmacol**, v. 2: p. 37–58, 2007.
- BENNET, J. E. Agentes antimicrobianos – agentes antifúngicos. In: BRUNTON, L. L., LAZO, J. S., PARKER, K. L. **Goodman & Gilman – As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 11<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

BERKER, D. Clinical practice: fungal nail disease. **N Engl J Med**, v. 14: p. 2108-16, 2009.

BISHNOI, A., VINAY, K., DOGRA, S. Emergence of recalcitrant dermatophytosis in India. **Lancet Infect. Dis.** v. 18: p. 250–251, 2018.

BITENCOURT, T. A., REZENDE, C. P., QUARESEMIN, N. R. *et al.* Extracellular Vesicles from the Dermatophyte *Trichophyton interdigitale* Modulate Macrophage and Keratinocyte Functions. **Front. Immunol.** v. 9: p. 23-43, 2018.

BITENCOURT, T. A., NEVES-DA-ROCHA, J., MARTINS, M. P. *et al.* StuA-Regulated Processes in the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*: Transcription Profile, Cell-Cell Adhesion, and Immunomodulation. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 2021.

BITEW, A. Dermatophytosis: Prevalence of Dermatophytes and Non-Dermatophyte Fungi from Patients Attending Arsho Advanced Medical Laboratory, Addis Ababa, Ethiopia. **Dermatology Research and Practice**, 2018.

BORBA, L. A. **Coloração de esporos em pelos na dermatofitose e comparação de técnicas de diagnóstico.** Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2010.

BORMAN, A. M., CAMPBELL, C. K., FRASER, M. *et al.* Analysis of the dermatophyte species isolated in the British Isles between 1980 and 2005 and review of worldwide dermatophyte trends over the last three decades. **Med Mycol**, v. 45: p. 131–41, 2007.

BRAND, A. Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. **Int J Microbiol**, v. 9: p. 517–529, 2012.

BRASIL, K. W., PINHEIRO, R. L., PIMENTEL, I. C. Laboratory diagnosis of superficial and cutaneous mycosis: a comparison of the potassium hydroxide and Calcofluor White methods. **An bras Dermatol**, v. 78, n. 5: p. 547-551, 2003.

BRAUNER, A., FRIDMAN, O., GEFEN, O., BALABAN, N. Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nat Ver Microbiol**, v. 14: p. 320-330, 2016.

BRESSAN, A. L., SILVA, R. S., FONSECA, J. C. *et al.* Majocchi's granuloma. **An Bras Dermatol**, v. 86: p. 797-8, 2011.

BRILHANTE, R. S. N., PAIXÃO, G. C., SALVINO, L. K. *et al.* Epidemiology and ecology of dermatophytosis in Fortaleza city: *Trichophyton tonsurans* as an important emergent pathogen of tinea capitis. **Rev Soc Bras de Medicina Tropical**, v. 33 n. 5: p. 417-425, 2000.

BROUTA, F., DESCAMPS, F., MONOD, M. *et al.* Secreted metalloprotease gene family of *Microsporum canis*. **Infect Immun.** v. 70: p. 5676–83, 2002.



BROWN, A. J. P., HAYNES, K., QUINN, J. Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. **Curr Opin Microbiol** v. 12: p. 384–91, 2009.

BUDAK, A., BOGUSZ, B., TOKARCZYK, M. *et al.* Dermatophytes isolated from superficial fungal infections in Krakow, Poland, between 1995 and 2010. **Mycoses**, v. 56: p. 422–8, 2013.

BURKHART, C. N., BURKHART, C. G., GUPTA, A. K. Dermatophytoma: recalcitrance to treatment because of existence of fungal biofilm. **J. Am. Acad. Dermatol.** v. 47, p. 629–631, 2002.

BURMESTER, A., SHELEST, E., GLOCKNER, G. *et al.* Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. **Genome Biol.** v. 12, 2011.

CABAÑES, F. J. Dermatophytes in domestic animals. **Rev Iberoam Micol.** Barcelona, v. 17: p. 04-108, 2001.

CAFARCHIA, C., ROMITO, D., CAPELLI, G. *et al.* Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis. **Veterinary Dermatology**, v. 17, n. 5: p.327-331, 2006.

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

CANNON, R. D., LAMPING, E., HOLMES, A. R. *et al.* Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews.** p. 291–321. 2009.

CARMO, P. H. F., COSTA, M. C., FRANCO, P. H. C. *et al.* Essential oils of *Taxandria fragrans* and *Melaleuca alternifolia* have effective antidermatophytic activities *in vitro* and *in vivo* that are antagonised by ketoconazole and potentiated in gold nanospheres. **Natural Product Research**, p. 1-4, 2020.

CARNEIRO, H. C. S., BASTOS, R. W., RIBEIRO, N. Q. *et al.* Hypervirulence and cross-resistance to a clinical antifungal are induced by an environmental fungicide in *Cryptococcus gattii*. **Science of the Total Environment**, v. 740: e140135, 2020.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J., TUR-TUR, C., HERNÁNDEZ-MOLINA, J. M. *et al.* Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. **Rev Iberoam Micol.** v. 27, n. 2: p. 49–56, 2010.

CARVALHO, G. G., FELIPE, M. P., COSTA, M. S. The photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on *Candida albicans* is dependent on medium conditions. **J Microbiol**, v. 47: p. 619–23, 2009.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **J Trop Med Hyg.** v. 24: p. 270-6, 1939.

CATTÂNEO, F. C. Frequência de fungos dermatófitos em onicomicoses. In: **Anais da Academia de Ciências e Tecnologia de São José do Rio Preto**. 2008.

CERVELATTI, E. P., FACHIN, A. L., FERREIRA-NOZAWA, M. S. *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen *Trichophyton rubrum*. **Med Mycol**. v. 44: n. 141–7, 2006.

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, 2012.

COELHO, L. M., AQUINO-FERREIRA, R., MAFFEI, C. M. L. *et al.* *In vitro* antifungal drug susceptibilities of dermatophytes microconidia and arthroconidia. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 62: p. 758–761, 2008.

COLELLA, M. T., CASTRO, M., MONTIEL, M. *et al.* Susceptibilidad antifúngica en dermatofitos. **Kasmera**. v. 34: p. 85-92. 2006.

COLEMAN, J. J., MYLONAKIS, E. Efflux in fungi: la piece de resistance. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 6, 2009.

COSTA-ORLANDI, C. B., MAGALHÃES, G. M., OLIVEIRA, M. B. *et al.* Prevalence of Dermatomycosis in a Brazilian Tertiary Care Hospital. **Mycopathologia**, v. 174, n. 5, p. 489–497, 2012.

COSTA-ORLANDI, C. B., SARDI, J. C. O., SANTOS, C. T. *et al.* *In vitro* characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. **Biofouling**, 30:6, 719-727, 2014.

COULIBALY, O., L'OLLIVIER, C., PIARROUX, R. *et al.* Epidemiology of human dermatophytoses in Africa. **Medical Mycology**, 0, 1–17, 2017.

CRIADO, P. R., DANTAS, K. C., BENINI, L. V., *et al.* Micoses superficiais e os elementos da resposta imune. **An Bras Dermatol**, 86(4):726-31, 2011.

DABAS, Y., XESS, I., SINGH, G. *et al.* Molecular identification and antifungal susceptibility patterns of clinical dermatophytes following CLSI and EUCAST guidelines. **J. Fungi (Basel)**, 2017.

DE FARIA, L. V., DO CARMO, P. H. F., COSTA, M. C. *et al.* *Acanthamoeba castellanii* as an alternative interaction model for the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Mycoses**, v. 63, n. 12: p. 1331-1340, 2020.

DE HOOG, S., MONOD, M., DAWSON, T. *et al.* Skin fungi from colonization to infection. **Microbiol Spectrum**, v. 5, n. 4: 2017.

DENG, W., LIANG, P., ZHENG, Y. *et al.* Differential gene expression in HaCaT cells may account for the various clinical presentation caused by anthropophilic and geophilic dermatophytes infections. **Mycoses**. 63(1):21-29, 2020.

- DIAO, Y., ZHAO, R., DENG, X. *et al.* Transcriptional profiles of *Trichophyton rubrum* in response to itraconazole. **Med Mycol**, v. 47: p. 237–247, 2009.
- DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annu Rev Immunol**, v. 27: p. 519–550, 2009.
- DOLENC-VOLJC, M. Dermatophyte infections in the Ljubljana region, Slovenia, 1995–2002. **Mycoses**, 48, 181, 2005.
- DONNELLY, R. F., MCCARRON, P. A., TUNNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiol Res**, 163(1):1-12, 2008.
- DRAKENSJÖ, I. T., CHRYSANTHOU, E. Epidemiology of dermatophyte infections in Stockholm, Sweden: a retrospective study from 2005-2009. **Med Mycol**, 49:484–8, 2011.
- DUEK, L., KAUFMAN, G., ULMAN, Y. *et al.* The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. **J Infect**. 48:175–80, 2004.
- EL-HALFAWY, O. M., VALVANO, M. A. Antimicrobial Heteroresistance: an emerging Field in Need of Clarity. **Clin. Microbiol Rev**. 28(1): 191–207, 2015.
- ELEWSKI, B. E.; TOSTI, A. Risk Factors and Comorbidities for Onychomycosis: Implications for Treatment with Topical Therapy. **The Journal of clinical and aesthetic dermatology**, v. 8, n. 11, p. 38–42, 2015.
- ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. **Rev Iberoam Micol**, 25(2): 101-6, 2008.
- FACHIN, A. L., MAFFEI, C. M., MARTINEZ-ROSSI, N. M. In vitro susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates to griseofulvin and tioconazole. Induction and isolation of a resistant mutant to both antimycotic drugs. **Mycopathologia**, 135:141–3, 1996.
- FACHIN, A. L., FERREIRA-NOZAWA, M. S., MACCHERONI JR, W. *et al.* Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. **Journal of Medical Microbiology**, vol. 55, no. 8, pp. 1093–1099, 2006.
- FANNING, S., MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **PLoS Pathog**, 2012.
- FARIA-RAMOS, I., FARINHA, S., NEVES-MAIA, J. *et al.* Development of cross-resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. **BMC Microbiology**, 14:155, 2014.
- FERNANDES, K. E., DWYER, C., CAMPBELL, L. T. *et al.* Species in the *Cryptococcus gattii* Complex Differ in Capsule and Cell Size following Growth under Capsule-Inducing Conditions. **mSphere**, v. 1, n. 6, 2016.

FERNÁNDEZ-TORRES, B., CARRILLO, A. J., MARTÍN, E. *et al.* *In vitro* activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45: p. 2524–2528, 2001.

FERNÁNDEZ-TORRES, B., INZA, I., GUARRO, J. *In vitro* activities of the new antifungal drug eberconazole and three other topical agents against 200 strains of dermatophytes. **J Clin Microbiol**, 41:5209–5211, 2003.

FERREIRA, G. F., BALTAZAR, L. M., SANTOS, J. R. A., *et al.* The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **J Antimicrob Chemother**, 68: 1801–1811, 2013.

FERREIRA, G. F., SANTOS, J. R. A., COSTA, M. C., *et al.* Heteroresistance to Itraconazole Alters the Morphology and Increases the Virulence of *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, 2015.

FERREIRA, G. F., SANTOS, D. A. Heteroresistance and fungi. **Mycoses**, p. 1–7, 2017.

FERREIRA, M. E. S., CAPELLARO, J. L., MARQUES, E. R. *et al.* *In vitro* evolution of itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* involves multiple mechanisms of resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4405–4413, nov. 2004.

FOSTER, K. W., GHANNOUM, M. A., ELEWSKI, B. E. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. **J Am Acad Dermatol**, 50:748–52, 2004.

FRIEDMAN, A. J., HAN, G., NAVATI, M. S., *et al.* Sustained release nitric oxide releasing nanoparticles: Characterization of a novel delivery platform based on nitrite containing hydrogel/glass composites. **Nitric Oxide**, 19, 12–20, 2008.

GADZALSKI, M., CIESIELSKA, A., STACZEK, P. Bioinformatic survey of ABC transporters in dermatophytes. **Gene** 576, 466–475, 2016.

GARCÍA-ROMERO, M. T.; LOPEZ-AGUILAR, E.; ARENAS, R. Onychomycosis in immunosuppressed children receiving chemotherapy. **Pediatric dermatology**, v. 31, n. 5, p. 618–620, 2014.

GARCIA G., H., CORDEIRO, R. T., BAGAGLI, E. PRP8 intein in dermatophytes: Evolution and species identification. **Medical Mycology**, n. January, p. 1–13, 2017.

GARMENDIA, J. L., VIEDMA, P.I., ARZA, J. M. Onicomicosis: diagnóstico y tratamiento. **Inf. Ter. Sist. Nac. Salud**, v. 32, p. 83, 2008.

GEFEN, O., BALABAN, N. Q. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. **FEMS Microbiol Ver**, v. 33: p. 704-717, 2009.

GHANNOUM, M.; ISHAM, N. Fungal nail infections (onychomycosis): a never-ending

story? **PLoS pathogens**, v. 10, n. 6, p. e1004105, jun. 2014.

GHELARDI, E., CELANDRONI, F., GUEYE, S. A., *et al.* Potential of Ergosterol Synthesis Inhibitors To Cause Resistance or Cross-Resistance in *Trichophyton rubrum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5: p. 2825–2829, 2014.

GNAT, S., ŁAGOWSKI, D., NOWAKIEWICZ, A., *et al.* Phenotypic characterization of enzymatic activity of clinical dermatophyte isolates from animals with and without skin lesions and humans. **Journal of Applied Microbiology**. v. 51, n. 3, p. 18–24, 2018.

GNAT, S., ŁAGOWSKI, D., DYLAŁ, M. *et al.* Modulation of *ERG* gene expression in fluconazole-resistant human and animal isolates of *Trichophyton verrucosum*. **Braz J Microbiol**, 2021.

GOMEZ-LOPEZ, A., CUENCA-ESTRELLA, M., MELLADO, E. *et al.* *In vitro* evaluation of combination of terbinafine with itraconazole or amphotericin B against *Zygomycota*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.45, p.199-202. 2003.

GORDON, A. K., MCIVER, C., KIM, M., *et al.* Clinical application of a molecular assay for the detection of dermatophytosis and a novel non-invasive sampling technique. **Pathology**. v. 48, p. 720-6, 2016.

GRAMINHA, M. A., ROCHA, E. M., PRADE, R. A. *et al.* Terbinafine resistance mediated by salicylate 1-monooxygenase in *Aspergillus nidulans*. **Antimicrob Agents Chemother**. 48:3530–5, 2004.

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

GRASER, Y., KUIJPERS, A. F. A., PRESBER, W. *et al.* Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. **J Clin Microbiology** 38, 3329-3336. 2000.

GROSS, O., POECK, H., BSCHEIDER, M. *et al.* Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. **Nature**, v. 459: p. 433–456, 2009.

GU, D., HATCH, M., GHANNOUM, M. *et al.* Treatment-resistant dermatophytosis: A representative case highlighting an emerging public health threat. **JAAD Case Reports**, v. 6: p. 1153-5, 2020.

GUPTA, A. K., COOPER, E. A., LYNDE, C. W. The efficacy and safety of terbinafine in children. **Dermatol Clin**. v. 21, n. 3: p. 511-20, 2003.

GUPTA, A. K., DAIGLE, D., CARVIEL, J. L. The role of biofilms in onychomycosis. **J. Am. Acad. Dermatol**. 74, 1241–1246, 2016.

GUPTA, A. K., KOHLI, Y. Evaluation of in vitro resistance in patients with onychomycosis who fail antifungal therapy. **Dermatology** 207: 375, 2003.

GUPTA, A. K., KOHLI, Y., LI, A., FAERGEMANN, J. *et al.* *In vitro* susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. **British Journal of Dermatology**, v. 142, p. 758-765, 2000.

GUPTA, A. K., TU, L. Q. Therapies for onychomycosis: a review. **Dermatologic clinics**, 24 (3), 375-379, 2006.

GUPTA, A. K.; VERSTEEG, S. G.; SHEAR, N. H. Onychomycosis in the 21st Century: An Update on Diagnosis, Epidemiology, and Treatment. **Journal of cutaneous medicine and surgery**, v. 21, n. 6, p. 525–539, 2017.

HAGHANI, I., SHOKONI, T., HAJHEIDARI, Z. *et al.* Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3–4, p. 315–321, 2013.

HALLIDAY, C. L., KIDD, S. E., SORRELL, T. C. *et al.* Molecular diagnostic methods for invasive fungal disease: the horizon draws nearer? **Pathology**. 47(3): 257-69, 2015.

HAO, X., YIM, J., FREEDMAN, D. *et al.* PAS stain based histological classification and severity grading of toenail onychomycosis. **Med Mycol**. v. 158, n. 4: p. 453-459, 2020.

HARRY, J. B., OLIVER, B. G., SONG, J. L., *et al.* Drug-induced regulation of the *MDR1* promoter in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Ch**, v. 49: p. 2785–2792, 2005.

HAVLICKOVA, B., CZAICA, V.A., FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**. v.51. p.2-15, 2008.

HAY, R. J., JOHNS, N. E., WILLIAMS, H. C., *et al.* The global burden of skin disease in 2010: an analysis of the prevalence and impact of skin conditions. **The Journal of investigative dermatology**, v. 134, n. 6, p. 1527–1534, 2014.

HAYETTE, M., SACHELI, R. Unusual Species of Dermatophytes: Rarely Identified or New? **Mycopathologia**, v. 182: p. 203–213, 2017.

HO, F. K., DELGADO-CHARRO, M. B., BOLHUIS, A. Evaluation of an Explanted Porcine Skin Model to Investigate Infection with the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, 185: p. 233–243, 2020.

HUANG, C., PENG, Y., ZHANG, Y. *et al.* Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*. **Lancet Infect Dis**, v. 19: p. 1380, 2019.

HUBE, B., HAY, R., BRASCH, J., *et al.* Dermatophytes and inflammation: the adaptive balance between growth, damage, and survival. **J. Mycol. Med.** 25, 2015.

JACOB, T. R., PERES, N. T., PERSINOTI, G. F. *et al.* *rpb2* is a reliable reference gene for quantitative gene expression analysis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Med Mycol**. v, 50, n. 4: p. 368-77, 2012.

JACOB, T. R., PERES, N. T., MARTINS, *et al.* Heat shock protein 90 (Hsp90) as a molecular target for the development of novel drugs against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Front. Microbiol.** 6:1241, 2015.

JENSEN, J. M., PFEIFFER, S., AKAKI, T. *et al.* Barrier function, epidermal differentiation, human  $\beta$ -defensin 2 expression in *Tinea corporis*. **J. Invest. Dermatol.** 127, 1720-7, 2007.

JOISH, V. N., ARMSTRONG, E. P. Newer drugs and overall costs of treating onychomycosis. **Rev Iberoam Micol**, 19(3): 130-132, 2002.

JUNGERMAN, P. F., SCHWARTZMAN, R. M. **Veterinary Medical Micrology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 3-28, 1972.

KAC, G. Molecular approaches to the study of dermatophytes. **Med Mycol.** v. 38, n. 5: p. 329-36, 2000.

KANAAN, I. C. S., KAC, B. K., CERQUEIRA, A. M. M., *et al.* Majocchi's granuloma - Case report. **An Bras Dermatol**, 90(2):251-3, 2015.

KANAFANI, Z. A., PERFECT, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact, **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1: p. 120-128, 2008.

KANO, R. ATP-binding Cassette (ABC) Transporter Proteins in Highly Terbinafine-resistant Strains of *Trichophyton indotineae* (Former Species Name: *Trichophyton interdigitale*). **Med. Mycol. J.**, v. 62, p. 21-25, 2021.

KAR, B., PATEL, P., FREE, S. J. *Trichophyton rubrum* LysM proteins bind to fungal cell wall chitin and to the N-linked oligosaccharides present on human skin glycoproteins. **PLoS ONE**, v. 14, 2019.

KARDEJEVA, V., SUMMERBELL, R., KANTARDJIEV, T., *et al.* Forty-Eight-Hour Diagnosis of Onychomycosis with Subtyping of *Trichophyton rubrum* Strains. **J Clin Microbiol**, 44: 1419–1427, 2006.

KAUFMAN, G., HORWITZ, B. A., DUEK, L., *et al.* Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. **Med Mycol.** 45:149–55, 2007.

KAUR, R., KASHYAP, B., BHALLA, P. Onychomycosis-epidemiology, diagnosis and management. **Indian J Med Microbiol**, 26:108-16, 2008.

KERNIEN, J. F., SNARR, B. D., SHEPPARD, D. C., *et al.* The Interface Between Fungal Biofilms and Innate Immunity. **Front. Immunol**, v. 8, n. 1968: p. 1–10, 2017.

KHAN, A., AHMAD, A., AKHTAR, F. *et al.* Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids, **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 1: p. 114-122, 2011.

KHANDELWAL, N. K., KAEMMER, P., FÖRSTER, T. M. *et al.* Pleiotropic effects of the vacuolar ABC transporter MLT1 of *Candida albicans* on cell function and virulence. **Biochem J.**, 473:1537-1552, 2016.

KHURANA, A., SARDANA, K., CHOWDHARY, A. Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. **Fungal Genetics and Biology**, 132, 2019.

KRAAIJEVELD, A. R., LAYEN, S. J., FUTERMAN, P. H., *et al.* Lack of Phenotypic and Evolutionary Cross-Resistance against Parasitoids and Pathogens in *Drosophila melanogaster*. **Plos**, 21, 2012.

LAM, P., KOK, S. H., LEE, K. K., *et al.* Sensitization of *Candida albicans* to terbinafine by berberine and berberrubine. **Biomedical Reports**.4: 449-452, 2016.

LEACH, M. D., BUDGE, S., WALKER, L., *et al.* Hsp90 orchestrates transcriptional regulation by Hsf1 and cell wall remodelling by MAPK signalling during thermal adaptation in a pathogenic yeast. **PLoS Pathog.** 2012.

LECHENNE, B., REICHARD, U., ZAUGG, C., *et al.* Sulphite efflux pumps in *Aspergillus fumigatus* and dermatophytes. **Microbiology**, 153:905–13, 2007.

LENG, W., LIU, T., WANG, J. *et al.* Expression dynamics of secreted protease genes in *Trichophyton rubrum* induced by key host's proteinaceous components. **Med Mycol**, 47: 759–765, 2008.

LI, X., UPADHYAY, A., BULLOCK, A. *et al.* Skin Stem Cell Hypotheses and Long Term Clone Survival – Explored Using Agent-based Modelling. **Sci Rep**, v. 3, n. 1904, 2013.

LIU, T., ZHANG, Q., WANG, L., *et al.* The use of global transcriptional analysis to reveal the biological and cellular events involved in distinct development phases of *Trichophyton rubrum* conidial germination. **BMC Genomics**, 8:100, 2007.

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. **Methods**, v. 25, n. 4: p. 402-8, 2001.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R., MANZANO-GAYOSSO, P., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F., *et al.* Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: an analysis of 2084 cases. **Med Mycol**, 48:476–9, 2010.

MA, H., HAGEN, F., STEKEL, D. J., *et al.* The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 106, n. 31, p. 12980-5, 2009.

MACCARTHY, K. G., BLAKE, J. S., JOHNSON, K. L., *et al.* Human dermatophyte-responsive T-cell lines recognize cross-reactive antigens associated with mannose-rich glycoproteins. **Exp Dermatol.** 3:66–71, 1994.



MANCIANTI, F., NARDONI, S., CECCHI, S., *et al.* Dermatophytes isolated from symptomatic dogs and cats in Tuscany, Italy during a 15-year period.

**Mycopathologia** 156, 13-18, 2003.

MANZANO-GAYOSSO, P., MENDEZ-TOVAR, L. J., HERNANDEZ-HERNANDEZ, F. *et al.* Antifungal resistance: an emerging problem in Mexico. **Gac Med Mex** 144: 23, 2008.

MARANHÃO, F. C. A., PAIÃO, F. G., FACHIN, A. L. *et al.* Membrane transporter proteins are involved in *Trichophyton rubrum* pathogenesis. **Journal of medical microbiology**, v. 58, n. Pt 2, p. 163–168, fev. 2009.

MARTINEZ, D. A., OLIVER, B. G., GRASER, Y., *et al.* Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection. **mBio**, 2012.

MARTINEZ-ROSSI, N. M., JACOB, T. R., SANCHES, P. R., *et al.* Heat shock proteins in dermatophytes: current advances and perspectives. **Curr. Genomics**, v. 17, p. 99–111, 2016.

MARTINEZ-ROSSI, N. M., PERES, N. T. A., ROSSI, A. Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166: p. 369–383, 2008.

MARTINEZ-ROSSI, N. M., BITENCOURT, T. A., PERES, N. T. A., *et al.* Dermatophyte Resistance to Antifungal Drugs: Mechanisms and Prospectus. **Front. Microbiol.**, v. 9: 1108, 2018.

MARTINS, M. P., SILVA, L. G., ROSSI, A. *et al.* Global Analysis of Cell Wall Genes Revealed Putative Virulence Factors in the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Front. Microbiol.**, v. 10, 2019.

McCLELLAN, K. J., WISEMAN, L. R., MARKHAM, A. Terbinafine: an update of its use in superficial mycoses. **Drugs**, 58:179–202, 1999.

MÉHUL, B., GU, Z., JOMARD, A., *et al.* Sub6 (Trir2), an onychomycosis marker revealed by proteomics analysis of *Trichophyton rubrum* secreted proteins in patient nail samples. **J Invest Dermatol**, v. 136: p. 331–333, 2016.

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

MERCER, D. K., STEWART, C. S. Keratin hydrolysis by dermatophytes. **Med. Mycol.** v. 57, p. 13–22, 2019.

MONOD, M. Secreted proteases from dermatophytes. **Mycopathologia** 166, 285–294, 2008.

MONOD, M., FEUERMANN, M., SALAMIN, K., *et al.* *Trichophyton rubrum* azole resistance mediated by a new ABC transporter, TruMDR3. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 63, n. 11, 2019.

- MORIELLO, K. A. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of published studies. **Veterinary Dermatology**, 15, 99-107, 2004.
- MROZ, P., YAROSLAVSKY, A., KHARKWAL, G. B. *et al.* Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers** (Basel), v. 3: p. 2516–2539, 2011.
- MULLER, W. H., GRIFFIN, C. E., CAMPBELL, K. L. Fungal and algal skin diseases. In: Muller, W.H. (org.). 7. ed. **Muller Kirk's Small Animal Dermatology**. Missouri: Elsevier, p. 223-283, 2013.
- MURRAY, P. J., WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol**, v. 11: p. 723–737, 2011.
- NENOFF, P., KRÜGER, C., GINTER-HANSELMAYER, G., *et al.* Mycology – an update. Part 1: dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. **J Dtsch Dermatol Ges**, 12:188–210, 2014.
- NGAMSKULRUNGROJ, P., CHANG, Y., HANSEN, B., *et al.* Characterization of the chromosome 4 genes that affect fluconazole-induced disomy formation in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.
- OLIVEIRA, P. F., ALVES, W. P., CAVALCANTI, V. F. A., *et al.* Growth Inhibition and Morphological Alterations of *Trichophyton Rubrum* Induced by Essential oil from *Cymbopogon Winterianus* Jowitt Ex Bor. **Braz J Microbiol**. v. 42, n. 1: p. 233-242, 2011.
- OSBORNE, C. S., LEITNER, I., HOFBAUER, B., *et al.* Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical *Trichophyton rubrum* isolate resistant to terbinafine. **Antimicrob Agents Chemother**. 50: 2234–6, 2006.
- OSBORNE, C. S., LEITNER, I., FAVRE, B., *et al.* Amino acid substitution in *Trichophyton rubrum* squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine. **Antimicrob Agents Chemother**, 49:2840–4, 2005.
- OUTERBRIDGE, C. A. Mycologic disorders of the skin. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 21, p. 128-134, 2006.
- PAI, V., GANAVALLI, A., KIKKERI, N. N. Antifungal resistance in dermatology. **Indian J. Dermatol**. 63, 361–368, 2018.
- PAIÃO, F. G., SEGATO, F., CURSINO-SANTOS, J. R., *et al.* Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic drugs. **FEMS Microbiol Lett**, 271:180–6, 2007.
- PEREIRA, D. B., MEIRELES, M. C. A. Doenças causadas por fungos e oomycetos: dermatofitoses. IN: RIET-CORREA, F., SCHILD, A. L., MÉNDEZ, M. C., LEMOS, R. A. A. **Doenças de ruminantes e equinos**. 2 ed., v. I, P. 367-373. São Paulo: Varela, 2001.

PEREIRA, M., FACHIN, A. L., MARTINEZ-ROSSI, N. M. The gene that determines resistance to tioconazole and to acridine derivatives in *Aspergillus nidulans* may have a corresponding gene in *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, 143:71–5, 1998.

PERES, N. T. A., DA SILVA, L. G., SANTOS, R. S., *et al.* *In vitro* and *ex vivo* infection models help assess the molecular aspects of the interaction of *Trichophyton rubrum* with the host milieu. **Medical Mycology**, v. 54, n. 4, p. 420-427, 2016.

PERES, N. T., MARANHÃO, F. C. A., ROSSI, A., *et al.* Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **An Bras Dermatol**. 85: 657-67, 2010.

PERFECT, J. R., DISMUKES, W. E., DROMER, F., *et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis** 50:291–222, 2010.

PERSINOTI, G. F., PERES, N. T. A., JACOB, T. R., *et al.* RNA-seq *Trichophyton rubrum* transcriptome analysis in response to the cytotoxic drug acriflavine. **BMC Genomics**, 2014.

PURIM, K. S., FREITAS, C. F., LEITE, N. Feet dermatophytosis in soccer players. In: **An Bras Dermatol**, 84 (5): 550-2, 2009.

QI, J., ZHOU, N., LI, L. *et al.* Ciclopirox activates PERK-dependent endoplasmic reticulum stress to drive cell death in colorectal cancer. **Cell Death Dis**, v. 11, p. 582, 2020.

RAJESWARY, S., KUMARAN, B., ILANGOVAN, R., *et al.* Modulation of antioxidant defense system by the environmental fungicide carbendazim in Leydig cells of rats. **Reprod Toxicol**, v. 24: p. 371–380, 2007.

REGDON, Z., DEMÉNY, M. A., KOVÁCS, K., *et al.* High-content screening identifies inhibitors of oxidative stress-induced parthanatos: cytoprotective and anti-inflammatory effects of ciclopirox. **Br J Pharmacol**. v. 178: p. 1095– 1113, 2021.

REZAEI-MATEHKOLAEI, A., MAKIMURA, K., DE HOOG, S., *et al.* Molecular epidemiology of dermatophytosis in Tehran, Iran, a clinical and microbial survey. **Med Mycol**. v. 51: p. 203-7, 2013.

REZENDE, C., BORSARI, G. P., CAVALCANTI, F. R. Estudo epidemiológico das dermatofitoses em instituições públicas da cidade de Barretos, São Paulo, Brasil. **Rev. Br. Anal. Clin.**, v. 40, p.13, 2008.

RIBEIRO, N. Q., COSTA, M. C., MAGALHÃES, T. F. F., *et al.* Atorvastatin as a promising anticryptococcal agent. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 49, 695–702, 2017.

ROBBINS, N., CAPLAN, T., COWEN, L. E. Molecular evolution of antifungal drug resistance. **Annu. Rev. Microbiol**. 71, 753–775, 2017.

ROCHA, M. F., ALENCAR, L. P., PAIVA, M. A., *et al.* Cross-resistance to fluconazole induced by exposure to the agricultural azole tetraconazole: an environmental resistance school? **Mycoses**, v. 59, n. 5, p. 281-90, 2016.

RODRIGUES, C. F., GONÇALVES, B., RODRIGUES, M. E. *et al.* The effectiveness of voriconazole in therapy of *Candida glabrata*'s biofilms oral infections and its influence on the matrix composition and gene expression. **Mycopathologia**, v. 182: p. 653–664, 2017.

ROSSI, S. A., TREVIJANO-CONTADOR, N., SCORZONI, L. *et al.* Impact of Resistance to Fluconazole on Virulence and Morphological Aspects of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Isolates. **Front Microbiol**, v. 7, p. 153, 2016.

ROUZAUD, C., CHOSIDOW, O., BROCARD, A., *et al.* Severe dermatophytosis in solid organ transplant recipients: A French retrospective series and literature review. **Transplant infectious disease: an official journal of the Transplantation Society**, v. 20, n. 1, 2018.

RUDRAMURTHY, S. M., SHANKARNARAYAN, S. A., DOGRA, S., *et al.* Mutation in the squalene epoxidase gene of *Trichophyton interdigitale* and *Trichophyton rubrum* associated with Allylamine resistance. **Antimicrob. Agents Chemother**, 62, 2018.

SABADIN, C. S., BENVENÚ, S. A., DA FONTOURA, M. M., *et al.* Onychomycosis and tinea pedis in athletes from the State of Rio Grande Do Sul (Brazil): a cross-sectional study. **Mycopathol.**, v. 3, p. 183, 2011.

SABOU, M., DENIS, J., BOULANGER, N., *et al.* Molecular identification of *Trichophyton benhamiae* in Strasbourg, France: a 9-year retrospective study. **Medical Mycology**, January, p. 1–12, 2017.

SANGLARD, D., COSTE, A., FERRARI, S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 7: p. 1029-1050, 2009.

SANGUINETTI, M., POSTERARO, B., ROMANO, L., *et al.* *In vitro* activity of *Citrus bergamia* (bergamot) oil against clinical isolates of dermatophytes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 59, 305–308. 2007.

SANGUINO, T. C., JARROS, I. C., NEGRI, M. Occurrence of dermatophytoses in patients from the Sistema Único de Saúde. **An Bras Dermatol**, 94(3):293-7, 2019.

SANTOS, D. A., HAMDAN, J. S. Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. **Jour Clin Microbiology**, p. 1917–1920, 2005.

SANTOS, H. L., LANG, E. A. S., SEGATO, F., *et al.* Terbinafine resistance conferred by multiple copies of the salicylate 1-monooxygenase gene in *Trichophyton rubrum*. **Med. Mycol.** 56, 378–381, 2018.

SANTOS, J. R. A., HOLANDA, R. A., FRASES, S., *et al.* Fluconazole Alters the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus gattii* and Leads to Distinct Behaviors in Murine Cryptococcosis. **PLOS ONE**, v. 9, 11, 2014.

SARDANA, K., KHURANA, A. Overview of causes and treatment of recalcitrant dermatophytosis. In: SARDANA, K., KHURANA, A., POOJARY, S., *et al.* (Eds.), **IADVL Manual on Management of Dermatophytoses**. CBS Publishers, New Delhi, pp. 80–102, 2018.

SCHALLER, M., BORELLI, C., BERGER, U. *et al.* Susceptibility testing of amorolfine, bifonazole and ciclopiroxolamine against *Trichophyton rubrum* in an *in vitro* model of dermatophyte nail infection, **Medical Mycology**, v. 47, n. 7: p. 753-758, 2009.

SHEKHOVA, E., KNIEMEYER, O., BRAKHAGE, A. A. Induction of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production by Itraconazole, Terbinafine, and Amphotericin B as a Mode of Action against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 11: 2017.

SCHRODER, K., TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140: p. 821–832, 2010.

SCHØSLER, L., ANDERSEN, L.K., ARENDRUP, M.C., *et al.* Recurrent terbinafine resistant *Trichophyton rubrum* infection in a child with congenital ichthyosis. **Pediatr. Dermatol.** v. 35, p. 259–260, 2018.

SCORZONI, L., DE PAULA, E., SILVA, A. C., *et al.* Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. **Front Microbiol.** v. 8, n. 36, 2017.

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

SEI, Y. Epidemiological survey of dermatomycoses in Japan. **Med Mycol J**, 53:185–92, 2012.

SEIDLER, M. J., SALVENMOSER, S., MULLER, F. M. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. **Antimicrob Agents Chemother.** 52:4130–4136, 2008.

SHAPIRO, R. S., ROBBINS, N., COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 75(2):213. 2011.

SHARMA, M., MANOHARLAL, R., NEGI, A. S., *et al.* Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin I in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis. **FEMS Yeast Research**, p.1-9, 2010.

SHAW, D., SINGH, S., DOGRA, S., *et al.* MIC and Upper Limit of Wild-Type Distribution for 13 Antifungal Agents against a *Trichophyton mentagrophytes- Trichophyton interdigitale* Complex of Indian Origin. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 64, n. 4: 2020.

SHIN, S., LIM, S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p.1289-1296, 2004.

SHIRWAIKAR, A. A., THOMAS, T., SHIRWAIKAR, A., *et al.* Treatment of onychomycosis: an update. **Indian. J. Pharm.**, v.70, p. 710, 2008.

SIGURGEIRSSON, B.; STEINGRÍMSSON, O. Risk factors associated with onychomycosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV**, v. 18, n. 1, p. 48–51, 2004.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2010.

SILVEIRA-GOMES, F., OLIVEIRA, E. F., NEPOMUCENO, L. B. *et al.* Dermatophytosis diagnosed at the Evandro Chagas Institute, Pará, Brazil. **Braz. J. Microbiol**, v. 44, n. 2, 2013.

SINGH, A., MASIH, A., KHURANA, A., *et al.*, High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. **Mycoses** 61, 477–484, 2018.

SIONOV, E., LEE, H., CHANG, Y. C., KWON-CHUNG, K. J. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. **PLoS Pathog**. 2010.

SIONOV, E., CHANG, Y. C., KWON-CHUNG, K. J. Azole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: emergence of resistant clones with chromosomal disomy in the mouse brain during fluconazole treatment. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 57, p. 5127-5130, 2013.

SIQUEIRA, E. R., SIQUEIRA, E. R., FERREIRA, J. C., *et al.* Ocorrência de dermatófitos em amostras de unhas, pés e mãos coletadas de estudantes universitários. **Rev Soc Bras Med Trop**, 39: 269-71, 2006.

SMIJS, T. G., PAVEL, S., TALEBI, M. *et al.* Preclinical studies with 5,10, 15-Tris(4-methylpyridinium)-20-phenyl-[21H,23H]-porphine trichloride for the photodynamic treatment of superficial mycoses caused by *Trichophyton rubrum*. **Photochem Photobiol** v. 85: p. 733–9, 2009.

SNELDERS, E., CAMPS, S. M. T., KARAWAJCZYK, A., *et al.* Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e31801, 2012.

SOARES, B. M., ALVES, O. A., FERREIRA, M. V., *et al.* *Cryptococcus gattii*: in vitro susceptibility to photodynamic inactivation. **Photochem Photobiol**, v. 87, n. 2, p. 357-64, 2011.

SOARES, B. M., SANTOS, D. A., KOHLER, L. M., *et al.* Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 242-245, 2008.

SONTHALIA, S.; AGRAWAL, M.; SEHGAL, V. N. Topical Ciclopirox Olamine 1%: Revisiting a Unique Antifungal. **Indian dermatology online journal**, v. 10, n. 4, p. 481–485, 2019.

SUBISSI, A., MONTI, D., TOGNI, G. *et al.* Ciclopirox: recent nonclinical and clinical data relevant to its use as a topical antimycotic agent. **Drugs**, v. 70, n. 16, p. 2133–2152, 2010.

SUGITA, T., TAJIMA, M., TSUBUKU, H., TSUBOI, R., NISHIKAWA, A. Quantitative analysis of cutaneous malassezia in atopic dermatitis patients using real-time PCR. **Microbiol Immunol.** 50(7):549-52, 2006.

SZABÓ, C., ISCHIROPOULOS, H., RADI, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6: p. 662–80, 2007.

TABORDA, C. P., SILVA, M. B., NOSANCHUK, J. D., *et al.* Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Mycopathologia.** 165, (4-5): 331–339, 2008.

TAMAYO, D., MUNOZ, J. F., TORRES, I., *et al.* Involvement of the 90 kDa heat shock protein during adaptation of *Paracoccidioides brasiliensis* to different environmental conditions. **Fungal Genet. Biol.** 51, 34–41, 2013.

TAMURA, T., ASAHARA, M., YAMAMOTO, M., *et al.* *In vitro* susceptibility of dermatomycoses agents to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index of combined effects of amorolfine and itraconazole in dermatophytes. **Microbiol Immunol**, v. 58: p. 1–8, 2014.

TIWARI, S., THAKUR, R., SHANKAR, J. Role of heat-shock proteins in cellular function and in the biology of fungi. **Biotechnol. Res. Int.** 2015.

VANDEPUTTE, P., FERRARI, S., COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **Int J Microbiol**, v. 2012: n. 713687, 2012.

VENA, G. A., CHIECO, P., POSA, F., *et al.* Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. **New Microbiologica**, v. 35. p. 207-213, 2012.

VENTURINI, J., ALVARES, A. M., CAMARGO, M. R., *et al.* Dermatophyte-host relationship of a murine model of experimental invasive dermatophytosis. **Microbes and Infection**, 14, 2012.

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

VERWEIJ, P. E., MELLADO, E., MELCHERS, W. J. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. **N Engl J Med**, 5,356(14): 1481-3, 2007.

VIRÁG, L., SZABÓ, E., GERGELY, P. *et al.* Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. **Toxicol Lett Apr**, v 11: p. 113–24, 2003.

WAGNER, K., SPRINGER, B., PIRES, V. P. *et al.* Molecular detection of fungal pathogens in clinical specimens by 18S rDNA high-throughput screening in comparison to ITS PCR and culture. **Sci Rep**, v. 8, n. 6964, 2018.

WANG, Y., AISEN, P., CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infect Immun**. 63 (8): 3131–3136, 1995.

WARYCHA, M. A., LEGER, M., TZU, J., *et al.* Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*, **Dermatol. Online J. V.** 17. N. 21, 2011.

WEESE, J. S., FULFORD, M. B. Fungal Diseases. **Companion Animal Zoonosis**. p. 275-298, 2015.

WEISCHENFELDT, J., PORSE, B. **Bone marrow-derived macrophages (BMM):** isolation and applications. CSH Protoc, 2008.

WELSH, O., WELSH, E., OCAMPO-CANDIANI, J., *et al.* Dermatophytoses in Monterrey, México. **Mycoses**, v. 49, p. 119, 2006.

WHITE, T. C., OLIVER, B. G., GRÄSER, Y., *et al.* Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. **Eukaryot Cell**, 7:1238–1245, 2008.

WIEDERHOLD, N., FOTHERGILL, N., McCARTHY, D. I., *et al.* Luliconazole Demonstrates Potent In Vitro Activity against Dermatophytes Recovered from Patients with Onychomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 58(6), 2014.

WIRSCHING, S., MORAN, G. P., SULLIVAN, D. J., *et al.* *MDR1*-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrob Agents Ch**, v. 45: p. 3416–3421, 2001.

YAMADA, T., MAEDA, M., ALSHAHNI, M. M., *et al.* Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. **Antimicrob. Agents Chemother**, 27,61(7), 2017.

YANG, Y. L., LO, H. J. Mechanisms of antifungal agents resistance. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 34, p. 79-86, 2001.

YANG, L. N., HE, M. H., OUYANG, H. B. *et al.* Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. **BMC Microbiol**, v. 19, n. 205, 2019.



YOUNGCHIM, S., PORNSUWAN, S., NOSANCHUK, J. D., *et al.* Melanogenesis in dermatophyte species *in vitro* and during infection. **Microbiology**, 157, 2348-56, 2011.

YU, L., ZHANG, W., WANG, L., *et al.* Transcriptional profiles of the response to ketoconazole and amphotericin B in *Trichophyton rubrum*. **Antimicrob Agents Chemother**, 51:144–53, 2007.

ZAIAS, N., REBELL, G. Clinical and mycological status of the *Trichophyton mentagrophytes (interdigitale)* syndrome of chronic dermatophytosis of the skin and nails. **Int J Dermatol**, 42: 779–788, 2003.

ZAVREL, M., WHITE, T. C. Medically important fungi respond to azole drugs: an update. **Future Microbiol**, v. 10, n. 8, p. 1355-73, 2015.

ZHAN, P., LIU, W. The changing face of dermatophytic infections worldwide. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1, p. 1–10, 2016.

ZURITA, J., HAY, R. J. Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes *in vitro*. **J Invest Dermatol**. 89:529–34, 1987.

## ANEXOS

### Anexo 1. Aprovação do projeto com experimentação animal na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG)

|   |  |
|---|--|
|    | <p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p>CEUA</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p> |
| <p>Prezado(a):</p>  |  |
| <p>Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.</p>   |  |
| <p>Protocolo CEUA: 228/2019</p>   |  |
| <p>Título do projeto: Influência da heterorresistência e resistência cruzada aos antifúngicos clínicos em agentes causadores de dermatofitose</p>   |  |
| <p>Finalidade: Pesquisa</p>   |  |
| <p>Pesquisador responsável: Daniel de Assis Santos</p>  |  |
| <p>Unidade: Instituto de Ciências Biológicas</p>  |  |
| <p>Departamento: Departamento de Microbiologia</p>  |  |
| <p>Situação atual: <a href="#">Decisão Final - Aprovado</a></p>   |  |
| <p>Aprovado na reunião do dia 07/10/2019. Validade: 07/10/2019 à 06/10/2024</p>   |  |
| <p>Belo Horizonte, 07/10/2019.</p>  |  |
| <p>Atenciosamente,</p>  |  |
| <p>Sistema Solicite CEUA UFMG<br/><a href="https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/">https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/</a></p>   |  |
| <p>Universidade Federal de Minas Gerais<br/>Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha<br/>Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005<br/>31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil<br/>Telefone: (31) 3409-4516<br/><a href="http://www.ufmg.br/bioetica/ceua">www.ufmg.br/bioetica/ceua</a> - <a href="mailto:ceua@pq.ufmg.br">ceua@pq.ufmg.br</a></p> |  |

**Anexo 2.** Artigos publicados como primeiro autor

- DE FARIA, LUCAS V.; DO CARMO, PAULO H. F.; COSTA, MARLIETE C.; PERES, NALU T. A.; CHAGAS, ISABELA A. RODRIGUES; FURST, CINTHIA; FERREIRA, GABRIELLA F.; COSTA, ADRIANA O.; SANTOS, DANIEL A. *Acanthamoeba castellanii* as an alternative interaction model for the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Mycoses**, v. 63, n. 12: p. 1331-1340, 2020.

- CARMO, PAULO H. F.; COSTA, MARLIETE C.; FRANCO, PEDRO H. C.; LAGE, ANNA C. P.; ROCHA, CLÁUDIA E. V.; CHAVES, CLAUDILENE R.; FARACO, ANDRÉ A. G.; LADEIRA, LUIZ O.; AGUILAR, JORGE L. LÓPEZ; CÉSAR, ISABELA C.; PAIXÃO, TATIANE A.; RESENDE-STOIANOFF, MARIA A.; SANTOS, DANIEL A. Essential oils of *Taxandria fragrans* and *Melaleuca alternifolia* have effective antidermatophytic activities *in vitro* and *in vivo* that are antagonised by ketoconazole and potentiated in gold nanospheres. **Natural Products Research**, v. 2, p. 1-4, 2020.

### Anexo 3. Artigos publicados como colaborador

GOUVEIA-EUFRASIO, LUDMILA RIBEIRO,, NOELLY QUEIROZ, SANTOS, JULLIANA RIBEIRO ALVES, DA COSTA, MARLIETE CARVALHO, EMÍDIO, ELÚZIA CASTRO PERES, DE FREITAS, GUSTAVO JOSÉ COTA, DO CARMO, PAULO HENRIQUE FONSECA, MIRANDA, BÁRBARA ALVES, DE OLIVEIRA, JOÃO CARLOS MAIA DORNELAS, DA SILVA, LÍVIA MARA VITORINO, TEIXEIRA LEOCÁDIO, VICTOR AUGUSTO, RANDI MAGALHÃES, VANESSA CAROLINE, PENIDO, INDIARA, PEREIRA, LEONARDO SOARES, RABELO, LÍVIA FROTA DE ALMEIDA, FARIA, FLÁVIO AUGUSTO TEIXEIRA, DUTRA, MARIA RITA, ASPAHAN, MÁIRA, DE PAULA, LUDMILA, DA SILVA, DIRCE INÊS TAVARES, MELO, MÁRCIA GREGORY DE ANDRADE, ZAMBELLI, VIRGINIA ANTUNES GOMES, FARACO, ANDRÉ AUGUSTO DA COSTA, CÉSAR, ISABELA, ALVES, GLAUCIENE PRADO , *et al.* ; Randomized, phase 1/2, double-blind pioglitazone repositioning trial combined with antifungals for the treatment of cryptococcal meningitis - PIO study. **Contemporary Clinical Trials Communications**, v. 10, n. 22, 100745, 2021.

- FERREIRA, JULIANA VELOSO; PIEROTTE, ISABELLA CAMPOLINA; RODRIGUES, FELIPE FERNANDES; SOUZA, LARISSA CAMILA RIBEIRO DE; BASTOS, RAFAEL WESLEY; CARMO, PAULO HENRIQUE FONSECA; CASSALI, GEOVANNI DANTAS; TAGLIATI, CARLOS ALBERTO; MACHADO, RENES RESENDE; SANTOS, DANIEL ASSIS; PIANETTI, GERSON ANTÔNIO; CÉSAR, ISABELA COSTA. Acute oral toxicity, antinociceptive and antimicrobial activities of kava dried extracts and synthetic kavain. **Natural Product Research**, v. 35, p. 1-6, 2021.

- COSTA, MARLIETE CARVALHO; BARROS FERNANDES, HELIANA; GONÇALVES, GLEISY KELLY NEVES; SANTOS, ANDERSON PHILIP NONATO; FERREIRA, GABRIELLA FREITAS; FREITAS, GUSTAVO JOSÉ COTA; CARMO, PAULO HENRIQUE FONSECA; HUBNER, JÔSY; EMÍDIO, ELÚZIA CASTRO PERES; SANTOS, JULLIANA RIBEIRO ALVES; SANTOS, JANE LIMA; REIS, ADELINA MARTHA; FAGUNDES, CAIO TAVARES; SILVA, ARISTÓBOLO MENDES; SANTOS, DANIEL ASSIS. 17- $\beta$ -estradiol increases macrophage activity

through activation of the GPER estrogen receptor and improves the response of female mice to *Cryptococcus gattii*. **Cellular Microbiology**, v. 22, n. 6: e13179, 2020.

- MAGALHÃES, THAIS FURTADO FERREIRA; COSTA, MARLIETE CARVALHO; HOLANDA, RODRIGO ASSUNÇÃO; FERREIRA, GABRIELA FREITAS; CARVALHO, VANESSA SILVA DUTRA; FREITAS, GUSTAVO JOSE COTA; RIBEIRO, NOELLY QUEIROZ; EMÍDIO, ELÚZIA CASTRO PERES; CARMO, PAULO HENRIQUE FONSECA; DE BRITO, CAMILA BERNARDO; DE SOUZA, DANIELE GLÓRIA; ROCHA, CLÁUDIA EMANUELA VIANA; PAIXÃO, TATIANE ALVES; DE RESENDE-STOIANOFF, MARIA APARECIDA; SANTOS, DANIEL ASSIS. N-acetylcysteine reduces amphotericin B deoxycholate nephrotoxicity and improves the outcome of murine cryptococcosis. **Medical Mycology**, v. 58, n. 6: p. 835-844, 2020.

- RIBEIRO, NOELLY QUEIROZ; SANTS, ANDERSON PHILIP NONATO; EMÍDIO, ELÚZIA CASTRO PERES; COSTA, MARLIETE CARVALHO; FREITAS, GUSTAVO JOSÉ COTTA; CARMO, PAULO HENRIQUE FONSECA; SILVA, MONIQUE FERREIRA; DE BRITO, CAMILA BERNARDO; DE SOUZA, DANIELE GLÓRIA; PAIXÃO, TATIANE ALVES; SANTOS, DANIEL ASSIS. Pioglitazone as an adjuvant of Amphotericin B for the treatment of cryptococcosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 54, n. 3: p. 301-308, 2019.

- VICTOR, MAURICIO M.; FARIAS, RAVIR R.; DA SILVA, DANIELLE L.; DO CARMO, PAULO H. F.; DE RESENDE-STOIANOFF, MARIA A.; VIEGAS, CLÁUDIO; ESPURI, PATRÍCIA F.; MARQUES, MARCOS J. Synthesis and Evaluation of Antifungal and Antitrypanosomastid Activities of Symmetrical 1,4-Disubstituted-1,2,3-Bistriazoles Obtained by CuAAC Conditions. **Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 4: p. 400-408, 2019.

**Anexo 4.** Artigos submetidos para publicação

- DORNELAS JCM, DO CARMO PHF, LANA UGP, LANA MAG, OLIVEIRA-PAIVA C, MARRIEL IE. Bioprospecting of *Actinobacteria* for biocontrol of *Pantoea ananatis*, causal agent of maize white spot disease.

- LAGE AC, CARMO PHF, AMORIM J, NETO R, LADEIRA L, MOSQUIERA L, SANTOS DA, CASTILHO R, TUNES L, FERREIRA D, MOREIRA P, FARACO A. Antiparasitic and anticancer activity of gold nanorods synthesized with natural polyphenols via seedless method.

- DORNELAS JCM, COSTA MC, CARMO PHF, PAIXÃO VM, CARVALHO VSD, CARRETO LC, GARCIA QS, BRAGANÇA GPP, ISAIAS RMS, BRITO JCM, RESENDE-STOIANOFF MA, SANTOS DA. *Nicotiana benthamiana* as a model for studying *Cryptococcus*-plant interaction

**Anexo 5.** Resumos publicados em anais de eventos científicos

- CARMO, P. H. F.; COSTA, M. C.; DE OLIVEIRA, J. C. M. D.; ALVES, B. M.; ALMEIDA, B. C. T.; GOUVEIA-EUFRASIO, L.; PERES, N. T. A.; SANTOS, D. A. Resistência adquirida ao itraconazol causa resistência cruzada entre antifúngicos e altera a interação de *Trichophyton interdigitale* com macrófagos. In: VII Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2020, Belo Horizonte. **Anais do VII Simpósio de Microbiologia da UFMG.** 2020.

- GOUVEIA-EUFRASIO, LUDMILA; COSTA, M. C.; EMÍDIO, E. C. P.; DE FREITAS, G. J. C.; CARMO, P. H. F.; REZENDE, M. C.; RODRIGUES, V. F.; RODRIGUES, J. G. M.; NEGRAO-CORREA, D. A.; SANTOS, D. A. Estudo da influência de *Strongyloides venezuelensis* na progressão da criptococose murina experimental. In: VII Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2020, Belo Horizonte. **Anais do VII Simpósio de Microbiologia da UFMG.** 2020.

- MIRANDA, B. A.; COSTA, M. C.; FERNANDES, H. B.; DO CARMO, PAULO HENRIQUE FONSECA; PAIXAO, V. M.; FREITAS, G. J. C.; SANTOS, DANIEL ASSIS. Interação de variações genotípicas na patogênese de *Cryptococcus spp.* em modelo de barreira hematoencefálica. In: VI Simpósio de Microbiologia da UFMG - Conecta SIM, 2019, Belo Horizonte. **Anais do VI Simpósio de Microbiologia da UFMG,** 2019.

- DO CARMO, PAULO HENRIQUE FONSECA; PAIXAO, V. M.; MAGALHAES, M. B.; COSTA, M. C.; SANTOS, DANIEL ASSIS. Heterorresistência e resistência cruzada aos antifúngicos clínicos em agentes causadores de dermatofitose. In: VI Simpósio de Microbiologia da UFMG - Conecta SIM, 2019, Belo Horizonte. **Anais do VI Simpósio de Microbiologia da UFMG,** 2019.

- GOUVEIA-EUFRASIO, L.; COSTA, M. C.; EMÍDIO, E. C. P.; FREITAS, G. J. C.; DO CARMO, P. H. F.; REZENDE, M. C.; RODRIGUES, V. F.; NEGRAO-CORREA, D.; SANTOS, D. A. Caracterização da influência de *Strongyloides venezuelensis* na progressão da criptococose murina experimental. In: VI Simpósio de Microbiologia

da UFMG - Conecta SIM, 2019, Belo Horizonte. **Anais do VI Simpósio de Microbiologia da UFMG**. 2019.

- EMÍDIO, ELÚZIA CASTRO PERES; COSTA, M. C.; FREITAS, GUSTAVO JOSE COTA; SANTOS, A. P. N.; DO CARMO, PAULO HENRIQUE FONSECA; RIBEIRO, NOELLY QUEIROZ; OLIVEIRA, L. V. N.; BASTOS, R. W.; PAIXÃO, TATIANE A.; SANTOS, DANIEL ASSIS. Caracterização da influência de *Staphylococcus aureus* na progressão da criptococose experimental. In: VI Simpósio de Microbiologia da UFMG - Conecta SIM, 2019, Belo Horizonte. **Anais do VI Simpósio de Microbiologia da UFMG**, 2019.

- SILVA, L. M. V.; FREITAS, GUSTAVO JOSE COTA; DO CARMO, PAULO HENRIQUE FONSECA; RIBEIRO, NOELLY QUEIROZ; SANTOS, DANIEL ASSIS. Avaliação do efeito de antibacterianos frente a linhagens de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. In: VI Simpósio de Microbiologia da UFMG - Conecta SIM, 2019, Belo Horizonte. **Anais do VI Simpósio de Microbiologia da UFMG**, 2019.

- GOUVEIA-EUFRASIO, L.; COSTA, M. C.; EMÍDIO, ELÚZIA CASTRO PERES; FREITAS, GUSTAVO JOSE COTA; DO CARMO, PAULO HENRIQUE FONSECA; REZENDE, M. C.; RODRIGUES, V. F.; NEGRAO-CORREA, D.; SANTOS, DANIEL ASSIS. Caracterização da influência de *Strongyloides venezuelensis* na progressão da criptococose murina experimental. In: VI Simpósio de Microbiologia da UFMG - Conecta SIM, 2019, Belo Horizonte. **Anais do VI Simpósio de Microbiologia da UFMG**, 2019.

- COSTA, MARLIETE C.; FERNANDES, H. B.; PAIXAO, V. M.; DO CARMO, PAULO HENRIQUE FONSECA; EMÍDIO, ELÚZIA CASTRO PERES; RIBEIRO, NOELLY QUEIROZ; SANTOS, DANIEL ASSIS. O papel de coinfeções bacterianas na transmigração *Cryptococcus gattii* pela barreira hematoencefálica humana. In: VI Simpósio de Microbiologia da UFMG - Conecta SIM, 2019, Belo Horizonte. **Anais do VI Simpósio de Microbiologia da UFMG**, 2019.



- FARIAS, R. R.; VICTOR, M. M.; SILVA, D. L.; CARMO, P. H. F.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; ESPURI, P. F.; VIEGAS JR, C.; MARQUES, M. J. Synthesis of symmetrical 1,4-disubstituted 1,2,3-bis-triazoles obtained by optimized CuAAC conditions and evaluation of antifungal and antitrypanosomastid activities. In: Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2018, Salvador. **Anais do 17 Brazilian Meeting on Organic Synthesis**, 2018.

- CARMO, P. H. F.; LAGE, A. C. P.; AGUILAR, J. L. L.; LADEIRA, L. O.; PAIXAO, T. A.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; SANTOS, D. A. Atividade antifúngica de nanopartículas de óleos essenciais para dermatofitose causada por *Trichophyton interdigitale* em modelo murino. In: V Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2018, Belo Horizonte. **Anais do V Simpósio de Microbiologia da UFMG**, 2018.

- CARMO, P. H. F.; BASTOS, R. W.; CARNEIRO, H. C. S.; COSTA, M. C.; BALTAZAR, L. M.; SANTOS, D. A.; RESENDE-STOIANOFF, M. A. Antifungal activity *in vitro* and *in vivo* of essential oils against dermatophytosis agents. **20th ISHAM Congress**. 2018.

**Anexo 6. Prêmios e títulos**

- Relevância Acadêmica na Categoria Pôster do V Simpósio de Microbiologia da UFMG.

Ano: 2018

**Anexo 7. Participação em eventos científicos**

- I Workshop de imunologia: atualizações imunológicas em tempos de COVID-19 –  
Participação

Ano: 2020.

- VII Simpósio de Microbiologia da UFMG – Participação

Ano: 2020

- VI Simpósio de Microbiologia da UFMG – Participação

Ano: 2019

- V Simpósio de Microbiologia da UFMG – Organização e Participação

Ano: 2018

- Congresso Latinoamericano de Microbiologia – Participação

Ano: 2018

## Anexo 8. Atividades desenvolvidas

Durante o doutorado foram realizados experimentos para complementação dos resultados obtidos ao longo do mestrado. Além disso, neste mesmo período, o artigo científico foi redigido, submetido e publicado. Estes experimentos abrangeram:

- Síntese de nanopartículas de ouro capeadas com os óleos essenciais de *Taxandria fragrans* e *Melaleuca alternifolia*;
- Caracterização das nanopartículas de ouro capeadas com os óleos essenciais;
- Determinação da CIM das nanopartículas de ouro capeadas com os óleos essenciais frente ao dermatófito *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533;
- Avaliação da toxicidade das nanopartículas de ouro capeadas com os óleos essenciais em macrófagos derivados de medula óssea;
- Análise da estabilidade dos óleos essenciais quando combinado ao antifúngico cetoconazol;
- Avaliação do tratamento em modelo murino de dermatofitose com as nanopartículas de ouro capeadas com os óleos essenciais;
- Avaliação histopatológica do tratamento em modelo murino de dermatofitose com as nanopartículas de ouro capeadas com os óleos essenciais.