

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

ANA CAROLINA COSTA MENEZES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NOVOS TIAZÓLICOS EM DERMATÓFITOS E O
USO DE *Tenebrio molitor* COMO MODELO DE INFECÇÃO**

Belo Horizonte

2024

ANA CAROLINA COSTA MENEZES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NOVOS TIAZÓLICOS EM DERMATÓFITOS E O
USO DE *Tenebrio molitor* COMO MODELO DE INFECÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Nalu Teixeira Aguiar Peres

Co-orientador:

Prof. Dr. Daniel Assis Santos

Belo Horizonte

2024

043

Menezes, Ana Carolina Costa.

Avaliação do efeito de novos tiazólicos em dermatófitos e o uso de *Tenebrio molitor* como modelo de infecção [manuscrito] / Ana Carolina Costa Menezes. – 2024.

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

Orientadora: Profa. Dra. Nalu Teixeira Aguiar Peres. Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Assis Santos.

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

1. Microbiologia. 2. Tinha. 3. Arthrodermataceae. 4. Tiazóis. 5. *Tenebrio*. I. Peres, Nalu Teixeira Aguiar. II. Santos, Daniel Assis. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA - SECRETARIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE ANA CAROLINA COSTA MENEZES
Nº REGISTRO: 2022660921

Às 14:00 horas do dia 30 de abril de 2024, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Paulo Henrique Fonseca do Carmo (UNESP), Eliane Patrícia Cervelatti (Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium) e o Prof. Nalu Teixeira de Aguiar Peres - Orientador, para julgar o trabalho final "Avaliação do efeito de novos tiazólicos em dermatofitos e o uso de *Tenebrio molitor* como modelo de infecção", da aluna Ana Carolina Costa Menezes, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Daniel de Assis Santos - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata 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. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 30 de abril de 2024.

Membros da banca:

Dr. Paulo Henrique Fonseca do Carmo

Dra. Eliane Patrícia Cervelatti

Orientadora:

Prof. Nalu Teixeira de Aguiar Peres

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos
(Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)

Ata de defesa de Dissertação/Tese 3221049 SEI 23072.224968/2024-67 / pg. 1



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 03/05/2024, às 15:28, 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 **Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Professora do Magistério Superior**, em 03/05/2024, às 16:17, 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 **Paulo Henrique Fonseca do Carmo, Usuário Externo**, em 06/05/2024, às 14:38, 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 **Eliane Patrícia Cervelatti, Usuário Externo**, em 07/05/2024, às 16:51, 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=8, informando o código verificador **3221049** e o código CRC **90959862**.

RESUMO

A dermatofitose é uma micose cutânea causada por fungos dermatófitos, denominada de acordo com o sítio de infecção (*Tinea corporis*, *Tinea capitis* e *Tinea pedis*). Esses fungos estão classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, a depender da morfologia dos conídios. Ademais, as espécies são divididas em geofílicas, zoofílicas e antropofílicas, conforme seu *habitat* natural. Os fatores de virulência dos fungos queratinolíticos estão associados à secreção de enzimas como proteases e lipases que atuam em amplo espectro de pH e em diversos substratos. O tratamento das dermatofitoses se baseia em medicamentos antifúngicos de uso tópico e sistêmico, utilizados em combinação ou não, pertencentes às classes das alilaminas, polienos, azólicos e equinocandinas. Os mecanismos de resistência que estimulam a busca de novos agentes terapêuticos envolvem a superexpressão de bombas de efluxo, mutações nos genes alvos, ativação de vias de sinalização em resposta ao estresse e enzimas de detoxificação celular. Modelos de infecção para o estudo da patogenicidade e de novos medicamentos para dermatófitos ainda são um desafio, principalmente para espécies antropofílicas. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a ação de novos compostos tiazólicos contra dermatófitos, seguido da avaliação e padronização de um modelo de infecção alternativo utilizando o invertebrado *Tenebrio molitor* para dermatófitos. O desenvolvimento desse modelo de infecção com larvas de *T. molitor* por dermatófitos permitirá o estudo da virulência de linhagens dos dermatófitos, por meio da análise da sobrevivência das larvas, bem como permitirá testar a ação dos novos compostos. Foram avaliadas a atividade de 53 novos compostos tiazólicos contra dermatófitos, pela análise de sua atividade fungicida e/ou fungistática, ensaios *in vitro* com fragmentos de unhas e de exoesqueleto de *T. molitor*, ação em biofilmes e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxinitrito (PRN). Deste modo, este trabalho traz novas perspectivas para o tratamento das dermatofitoses, contribuindo também para o desenvolvimento de estratégias para o estudo e avaliação da patogenicidade e estudo de novos compostos com ação contra dermatófitos.

Palavras-chave: Dermatofitose; Dermatófitos; Novos compostos tiazólicos; Modelo de infecção; *Tenebrio molitor*.

ABSTRACT

Dermatophytosis is a cutaneous mycosis caused by dermatophyte fungi, named according to the site of infection (*Tinea corporis*, *Tinea capitis* and *Tinea pedis*). These fungi are classified into three genera: *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton*, depending on the morphology of the conidia. Furthermore, species are divided into geophilic, zoophilic and anthropophilic, depending on their natural habitat. The virulence factors of keratinolytic fungi are associated with the secretion of enzymes such as proteases and lipases that act across a broad pH spectrum and on different substrates. The treatment of dermatophytosis is based on antifungal medications for topical and systemic use, used in combination or not, belonging to the classes of allylamines, polyenes, azoles and echinocandins. The resistance mechanisms that stimulate the search for new therapeutic agents involve the overexpression of efflux pumps, mutations in target genes, activation of signaling pathways in response to stress and cellular detoxification enzymes. Infection models for studying pathogenicity and new drugs for dermatophytes are still a challenge, especially for anthropophilic species. Thus, the objective of this study was to analyze the action of new thiazole compounds against dermatophytes, followed by the evaluation and standardization of an alternative infection model using the invertebrate *Tenebrio molitor* for dermatophytes. The development of this model of infection with *T. molitor* larvae by dermatophytes will allow the study of the virulence of dermatophyte strains, through the analysis of larvae survival, as well as testing the action of new compounds. The aim is to evaluate the activity of 53 new thiazole compounds against dermatophytes, through analysis of their fungicidal and/or fungistatic activity, *in vitro* testing of nail fragments and exoskeleton of *T. molitor*, action on biofilms and production of species reactive oxygen (ROS) and peroxyxynitrite (PRN). Therefore, this work brings new perspectives to the treatment of dermatophytosis, and also contributes to the development of strategies to study and to evaluate the pathogenicity and new compounds that act on dermatophytes.

Keywords: Dermatophytosis; Dermatophytes; New thiazole compounds; Infection model; *Tenebrio molitor*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: ágar água

ABD: ágar batata dextrose

AEM: ágar extrato de malte

AnfB: anfotericina B

ASD: ágar sabouraud dextrose

ATPase: adenosinatrifosfatases

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CIM: concentração inibitória mínima

CFLU: Calcofluor

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CN: Câmara de Neubauer

CSD: caldo sabouraud dextrose

DMSO: dimetilsulfóxido

DTT: DL-Ditiotreitol

HaCaT: linhagem celular de queratinócitos imortais aneuploides da pele humana adulta

Hsp90: *Heat Shock Protein 90*

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IL-1: interleucina-1

IL-12: interleucina-12

IFN- γ : interferon-gama

ITR: itraconazol

KCl: cloreto de potássio

MOPS: ácido morfolino-propano-sulfônico

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NaCl: cloreto de sódio

PCR: reação em cadeia da polimerase

PRN: peroxinitrito

RNA_m: RNA mensageiro

ROS: espécies reativas de oxigênio

SBD: Sociedade Brasileira de Dermatologia

SDS: dodecil sulfato de sódio

TERB: terbinafina

UFC: unidades formadoras de colônia

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

VC: Vermelho Congo

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

LISTAS DE QUADROS

Quadro 1. Classificação de algumas espécies de dermatófitos conforme preferência de hospedeiro	22
Quadro 2. Identificação dos compostos avaliados neste estudo, cedidos pela Profa. Renata Oliveira	44
Quadro 3. Compostos selecionados após análise da CIM	55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** CIM dos 53 compostos tiazólicos para *T. rubrum*, determinada pelo método de microdiluição em meio sólido utilizando ASD 50
- Tabela 2.** CIM dos 53 compostos tiazólicos para *T. rubrum*, determinada pelo método de microdiluição em caldo em meio RPMI 52
- Tabela 3.** CIM de 06 compostos tiazólicos para *T. interdigitale*, *T. tonsurans* e *T. equinum*, determinada pelo método de diluição em meio sólido ASD 55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das formas específicas de dermatofitose em humanos com a localização anatômica de tecidos e órgãos da infecção	17
Figura 2. Esquema dos alvos e mecanismos de ação dos agentes antifúngicos	38
Figura 3. Crescimento de <i>T. rubrum</i> tratados com os compostos tiazólicos para avaliar a atividade fungicida e fungistática	57
Figura 4. Atividade dos compostos tiazólicos no crescimento de <i>T. rubrum</i> em fragmentos de unhas	58
Figura 5. Avaliação da atividade dos compostos tiazólicos no crescimento de <i>T. rubrum</i> em exoesqueletos de <i>T. molitor</i>	59
Figura 6. Ação dos compostos tiazólicos na biomassa (A e B) e na viabilidade (C e D) do biofilme maduro de <i>T. rubrum</i> , nas concentrações sub-inibitórias (A e C) e inibitórias (B e D)	61
Figura 7. Ação dos compostos tiazólicos na biomassa (A e B) e na viabilidade (C e D) do biofilme em maturação de <i>T. rubrum</i> , nas concentrações sub-inibitórias (A e C) e inibitórias (B e D)	63
Figura 8. Atividade dos compostos tiazólicos na produção de ROS em <i>T. rubrum</i> após 03 (A e B) e 24 (C e D) horas, nas concentrações sub-inibitórias (A e C) e inibitórias (B e D)	65
Figura 9. Atividade dos compostos tiazólicos na produção de PRN em <i>T. rubrum</i> após 03 (A e B) e 24 (C e D) horas, nas concentrações sub-inibitórias (A e C) e inibitórias (B e D)	67
Figura 10. Efeito da exposição de <i>T. rubrum</i> aos compostos tiazólicos na suscetibilidade a diferentes agentes estressores	69
Figura 11. Curva de sobrevivência das larvas de <i>T. molitor</i> infectadas com 5×10^5 con/mL de <i>T. rubrum</i> ao longo de 25 dias	87
Figura 12. Curva de sobrevivência das larvas de <i>T. molitor</i> infectadas com 5×10^3 con/mL de <i>T. rubrum</i> ao longo de 45 dias	88
Figura 13. Curva de sobrevivência das larvas de <i>T. molitor</i> infectadas com $1,075 \times 10^4$ con/mL de <i>T. rubrum</i> ao longo de 10 dias	89

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 AS DERMATOFITOSSES	16
2.1.1 Manifestações clínicas	18
2.1.2 Diagnóstico	19
2.2 FUNGOS DERMATÓFITOS	20
2.2.1 Fatores de patogenicidade	23
2.2.2 Mecanismos de resistência	26
2.3 MODELOS DE INFECÇÃO	27
2.3.1 Modelos de vertebrados	30
2.3.2 Modelos de invertebrados	31
2.4 TRATAMENTO DAS DERMATOFITOSSES	33
3 JUSTIFICATIVA	39
4 OBJETIVO GERAL	40
CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS TIAZÓLICOS EM DERMATÓFITOS	
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
5 METODOLOGIA	42
5.1 MICRORGANISMOS	42
5.2 MEIOS DE CULTURA	42
5.3 PREPARO DO INÓCULO	43
5.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	43
5.5 AÇÃO FUNGICIDA E FUNGISTÁTICA	46
5.6 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO <i>in vitro</i> DE UNHA E DE EXOESQUELETO	46
5.7 AÇÃO DOS COMPOSTOS NO BIOFILME MATURADO	46
5.8 AÇÃO DOS COMPOSTOS NA MATURAÇÃO DO BIOFILME	47
5.9 QUANTIFICAÇÃO DE ROS E PRN	48
5.10 AVALIAÇÃO DE ESTRESSORES EM <i>T. rubrum</i> COM OS COMPOSTOS	48
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49

6 RESULTADOS	50
6.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	50
6.1.1 CIM dos compostos tiazólicos em meio sólido para <i>T. rubrum</i> ..	50
6.1.2 CIM de compostos tiazólicos em caldo para <i>T. rubrum</i>	52
6.1.3 CIM de compostos tiazólicos em meio sólido para <i>T. interdigitale</i> , <i>T. tonsurans</i> e <i>T. equinum</i>	54
6.2 AÇÃO FUNGICIDA E FUNGISTÁTICA	56
6.3 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>T. rubrum</i>	58
6.4 AÇÃO DOS COMPOSTOS NO BIOFILME	59
6.4.1 Quantificação da biomassa e avaliação da viabilidade do biofilme maduro	59
6.4.2 Quantificação da biomassa e avaliação da viabilidade do biofilme em maturação	62
6.5 QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) APÓS EXPOSIÇÃO	64
6.6 QUANTIFICAÇÃO DE PEROXINITRITO (PRN) APÓS EXPOSIÇÃO ...	66
6.7 AVALIAÇÃO DE ESTRESSORES EM <i>T. rubrum</i>	68
7 DISCUSSÃO	70
8 CONCLUSÃO	80
9 PERSPECTIVAS	82
CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ALTERNATIVO DE INFECÇÃO EM LARVAS DE <i>T. MOLITOR</i> POR DERMATÓFITOS	
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	83
5 METODOLOGIA	84
5.12 MICRORGANISMOS	84
5.13 MEIOS DE CULTURA	84
5.14 QUESTÕES ÉTICAS	84
5.15 PREPARO DO INÓCULO	85
5.16 ENSAIOS DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>T. molitor</i>	86
5.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA	86
6 RESULTADOS	87
6.8 ENSAIOS DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>T. molitor</i>	87
7 DISCUSSÃO	90
8 CONCLUSÃO	92

9 PERSPECTIVAS	93
10 INOVAÇÃO E CONTRIBUIÇÃO DO TRABALHO	94
11 LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PRINCIPAIS POSSÍVEIS PROBLEMAS	94
REFERÊNCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

Os dermatófitos são fungos que causam infecções cutâneas em humanos e animais, representando um desafio significativo para a saúde pública. O diagnóstico da dermatofitose envolve a análise do histórico clínico e de fatores de risco, um exame físico minucioso, reconhecendo os sintomas característicos (prurido, eritema e descamação) e realização de métodos laboratoriais, como o exame direto ao microscópio e cultura de amostras de pele, cabelo ou unhas.

Dentre as classes de antifúngicos mais utilizadas no tratamento das dermatofitoses estão os compostos azólicos, os quais são amplamente empregados devido à sua eficácia e segurança. Entretanto, a resistência aos azólicos e a necessidade de terapias alternativas evidenciam a importância e necessidade da avaliação contínua da ação desses compostos. Os compostos azólicos desempenham sua atividade antifúngica inibindo a enzima lanosterol 14- α -demetilase, interferindo na síntese do ergosterol, um componente essencial da membrana fúngica. Este trabalho avalia a eficácia de novos compostos azólicos contra dermatofitoses, fornecendo dados sobre a atividade desses agentes contra os dermatófitos mais comuns na clínica humana.

A compreensão da virulência dos dermatófitos e de sua resistência aos antifúngicos são essenciais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes contra as dermatofitoses. Neste contexto, a utilização de modelos experimentais apresenta um importante papel na avaliação da patogenicidade dos dermatófitos e no efeito de potenciais agentes antifúngicos. *Tenebrio molitor* surge como um modelo promissor, acessível e econômico para essas avaliações, devido à sua suscetibilidade a dermatófitos e à sua viabilidade como modelo experimental, em função de sua facilidade de criação e manipulação em laboratório e de suas características fisiológicas e genéticas. Além disso, a capacidade desse inseto em fornecer resultados rápidos e reproduzíveis, o torna um modelo experimental alternativo ideal para avaliar a eficácia de antifúngicos em condições controladas.

Ao abordar essas questões fundamentais, espera-se que este estudo possa ter um impacto significativo na prática clínica e na saúde pública, melhorando os resultados do tratamento e reduzindo a morbidade associada às dermatofitoses.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AS DERMATOFITOSES

As doenças causadas por fungos podem ser classificadas em superficiais, cutâneas, subcutâneas, profundas e oportunistas (OLIVEIRA, 2014). As dermatofitoses são as micoses cutâneas mais comuns (PERES *et al.* 2010), e são causadas por fungos filamentosos queratinolíticos, isto é, capazes de metabolizar a queratina existente no estrato córneo da pele, unhas e cabelos, como fonte de nutrientes (MARTINEZ-ROSSI *et al.* 2021).

A dermatofitose é uma doença fúngica cutânea amplamente distribuída em todo o mundo, afetando milhões de indivíduos. De acordo com estudos epidemiológicos recentes, estima-se que essa doença acomete cerca de 25% da população mundial, com taxas mais altas em áreas tropicais e subtropicais devido às condições ambientais favoráveis ao crescimento desses fungos, como clima, umidade e temperatura. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) destacam que 30% a 70% dos adultos são portadores assintomáticos da dermatofitose, representando uma carga significativa para os sistemas de saúde (PETRUCELLI *et al.* 2020).

No Brasil, os dados epidemiológicos mostram que a prevalência da dermatofitose no país varia entre 18% e 23%, com a ocorrência de espécies distintas nas regiões Sul e Norte do país. Em termos de incidência, estima-se que ocorram aproximadamente 2 milhões de novos casos de dermatofitose por ano no país, representando uma carga substancial para o sistema de saúde. Além disso, a dermatofitose é mais comum em crianças e adultos jovens, sendo frequentemente observada em ambientes urbanos e em comunidades de baixa renda (DALLA LANA *et al.* 2016). Entretanto, acredita-se que esses valores estão subestimados, devido à falta de diagnóstico laboratorial e notificação da doença, enfatizando a importância da vigilância epidemiológica contínua e da implementação de estratégias eficazes de prevenção e controle da dermatofitose em nível global e no Brasil, incluindo medidas de educação em saúde e acesso a tratamento adequado.

As dermatofitoses são denominadas de acordo com o local em que ocorre a infecção, como por exemplo *Tinea corporis* que acomete tronco, braços e pernas, *Tinea capitis* que envolve o couro cabeludo e *Tinea pedis* que afeta os pés. Em algumas regiões com características climáticas distintas, a prevalência das formas

clínicas podem variar, isto é, em países ocidentais *Tinea pedis* e onicomicose (infecção das unhas) são mais prevalentes, enquanto *Tinea capitis* e *Tinea corporis* são comuns em áreas tropicais (HAYETTE e SACHELI, 2015). As dermatofitoses também incluem *Tinea cruris* com lesões na região da virilha, *Tinea barbae* para lesões na região da barba e do bigode e *Tinea unguium* ou onicomicose que afetam as unhas. Durante a pandemia de COVID-19, foi observado aumento de casos de *Tinea faciei* devido ao uso de máscaras (BORTOLUZZI; BONESCHI; VERALDI, 2022). Os locais das infecções fúngicas mencionados acima estão ilustrados na figura 1 (KESHWANIA *et al.* 2023).

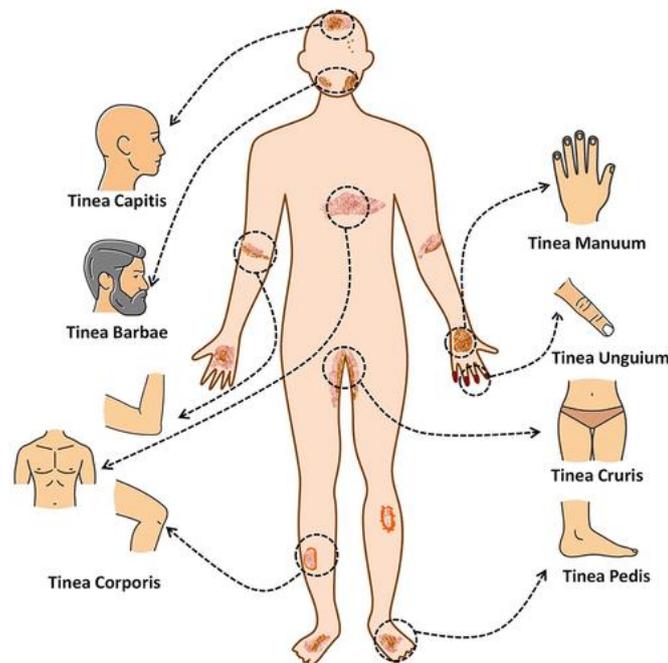


Figura 1. Representação das formas específicas de dermatofitose em humanos com a localização anatômica de tecidos e órgãos da infecção. Fonte: KESHWANIA *et al.* 2023.

De acordo com a Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD) em 2021, as fontes de infecção podem ser o solo, o homem e certos animais, como por exemplo cães, gatos, porcos, gados, aves, peixes, entre outros. Estima-se que mais de 30 espécies possuem habilidade para causar infecções em diversos tecidos humanos (SBD, 2021). A transmissão de dermatófitos pode acontecer por contato direto com humanos ou animais infectados ou indiretamente por meio de fômites contaminados (PIRES *et al.* 2014).

A patogênese das dermatofitoses resulta da interação de elementos fúngicos e dos hospedeiros, permitindo o estabelecimento da infecção que acontece juntamente com a ativação do sistema imune. A instalação dessa infecção requer que o fungo seja capaz de vencer as barreiras do hospedeiro, tais como acidez e descamação da pele, presença de substâncias inibitórias (ácidos graxos e peptídeos antimicrobianos) e ação dos fagócitos (MARTINEZ-ROSSI *et al.* 2017).

2.1.1 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da dermatofitose podem variar amplamente conforme a região do corpo afetada e o agente causador (DALLA LANA *et al.* 2016). Como os sinais e sintomas das dermatofitoses são variados e podem afetar diferentes áreas corporais, geralmente os mais comuns são: dermatite, prurido, manchas vermelhas, descamação da pele, perda de cabelo e erupções cutâneas (KESHWANIA *et al.* 2023).

Nessa perspectiva, a dermatofitose pode se manifestar clinicamente de forma típica ou atípica. As manifestações clínicas típicas incluem lesões eritematosas, descamativas e circulares com bordas bem delimitadas, frequentemente acompanhadas de prurido intenso. Essas lesões geralmente ocorrem em áreas do corpo expostas a ambientes quentes e úmidos, como o couro cabeludo, as unhas, a virilha e os pés (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

No entanto, a dermatofitose também pode apresentar manifestações atípicas, como lesões vesiculosas, pustulosas, hiperpigmentadas ou mesmo apresentar-se como uma forma disseminada da doença. A presença desses sinais podem ser desafiadoras para o diagnóstico clínico e confundidas com outras condições dermatológicas, sendo necessário a realização de um diagnóstico diferencial (DOGRA; NARANG, 2017).

Dessa maneira, compreender as diferentes manifestações clínicas da dermatofitose é importante para garantir um diagnóstico correto e preciso, e assim permitir a escolha de um tratamento eficaz e resolutivo para os pacientes acometidos por essa infecção.

2.1.2 Diagnóstico

A abordagem diagnóstica das dermatofitoses envolve uma combinação de métodos clínicos, microbiológicos e laboratoriais. Clinicamente, a dermatofitose é caracterizada pela avaliação das lesões cutâneas. A confirmação do diagnóstico é realizada submetendo as amostras de lesões cutâneas a exames microscópicos diretos, cultura fúngica e testes moleculares (TAVARES *et al.* 2021).

Uma abordagem clássica utilizada para recuperar o fungo de amostras clínicas é o exame microscópico direto, o qual possibilita a visualização e caracterização de hifas e artroconídios característicos dos dermatófitos. Além disso o cultivo micológico indica a presença das estruturas de reprodução e ornamentação (DE AGUIAR *et al.* 2022).

O isolamento e identificação dos fungos causadores da dermatofitose é realizado em meios de cultura ricos em glicose e peptona, como o ágar sabouraud dextrose (ASD), suplementados com antibacterianos. O crescimento das culturas fúngicas levam em torno de 14 dias à temperatura de 25-28 °C e permite a análise das características macromorfológicas e a avaliação da sensibilidade aos antifúngicos (REIS-GOMES *et al.* 2012). As características morfológicas dos dermatófitos podem ser avaliadas em meios convencionais, como o ASD, observando macroscopicamente a aparência, o tamanho e a coloração da colônia e a produção de pigmentos; microscopicamente, a forma, o tamanho e a disposição dos conídios e a presença de clamidoconídios e as alterações na morfologia das hifas (KANE, 1997).

O diagnóstico dessa doença também pode ser realizado por métodos moleculares utilizando material genético previamente extraído por reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR, convencional ou em tempo real, oferece alta sensibilidade e especificidade, bem como menor tempo de resposta quando comparado com os métodos convencionais na detecção de DNA fúngico em amostras clínicas (BEGUM *et al.* 2020), entretanto, essa metodologia ainda não é utilizada na rotina laboratorial.

O diagnóstico preciso da dermatofitose é essencial para um tratamento adequado, para mitigar as complicações e para reduzir a disseminação da infecção. Nesse contexto, em 2006, Siqueira e colaboradores avaliaram 280 amostras de unhas ou pele de estudantes universitários entre 18 e 25 anos, obtidas por raspagem superficial. Realizou-se o exame micológico direto, isolamento de dermatófitos e identificação dos gêneros e espécies baseada em características macro e microscópicas, além de testes de hidrólise da ureia, sendo observada prevalência de

dermatofitose nas lesões cutâneas de 18,2% nessa população analisada (SIQUEIRA *et al.* 2006).

Por outro lado, a detecção e identificação de dermatófitos em amostras de unha, pele e cabelo por métodos moleculares contribuirá com a redução do tempo de observação com os métodos baseados em culturas por serem mais sensíveis, mas não substitui os exames microscópico e a cultura (HAYETTE e SACHELI, 2015). Todavia, o trabalho de Begum e colaboradores (2020), conclui que a preocupação da escolha de qual técnica aplicar para o diagnóstico da dermatofitose é multifatorial e dependente das instalações e condições de cada laboratório (BEGUM *et al.* 2020).

2.2 FUNGOS DERMATÓFITOS

Os dermatófitos são fungos filamentosos que compartilham características taxonômicas, morfológicas, fisiológicas e de antigenicidade análogas (LACAZ *et al.* 2002). Por se tratar de fungos queratinofílicos, são capazes de metabolizar e utilizar a queratina presente na pele, cabelos e unhas como fonte de nutrientes (PERES *et al.* 2010).

Esses fungos apresentam estruturas filamentosas multicelulares (hifas), hialinas, septadas e reprodução assexuada ou sexuada (SIDRIM *et al.* 2004). As hifas compõem o micélio do fungo e são essenciais para a absorção de nutrientes e a colonização do tecido hospedeiro (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995). Os conídios são estruturas de dispersão assexuada produzidas pelos dermatófitos, formados nas extremidades das hifas ou conidióforos e liberados no ambiente para infectar outros hospedeiros (HAVLICKOVA, CZAICA e FRIEDRICH, 2008).

Metin e Heitman discutem a natureza dualística dos dermatófitos em termos de sua reprodução, isto é, explora os mecanismos subjacentes à reprodução assexuada, com a produção de conídios, e à reprodução sexual, que envolve a formação de esporângios. A sua capacidade de reproduzir de forma assexuada permite uma rápida disseminação e colonização do hospedeiro, enquanto a reprodução sexual pode contribuir para a variabilidade genética e potencialmente para a adaptação a novos ambientes ou pressões seletivas. (METIN e HEITMAN, 2020).

Os dermatófitos são classificados de acordo com seu habitat natural, sendo geofílicos, zoofílicos e antropofílicos, estando presentes no solo, em animais e humanos, respectivamente. As infecções fúngicas que atingem os humanos são

desencadeadas principalmente por dermatófitos zoofílicos e antropofílicos (HAYETTE e SACHELI, 2015).

Os fungos geofílicos são saprófitas do solo e capazes de colonizar tecidos queratinizados de estruturas em decomposição, tais como cascos, chifres, pêlos, penas e escamas. Poucas espécies geofílicas podem infectar seres humanos e animais, sendo que *Microsporium gypseum* apresenta maior virulência (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995). Além disso, essa espécie está associada a infecções cutâneas superficiais, como *Tinea corporis* e *Tinea capitis* e possui potencial zoonótico, podendo ser transmitido de animais para humanos e vice-versa (MA *et al.* 2022).

Os dermatófitos zoofílicos infectam preferencialmente espécies de felinos, aves, caninos, bovinos e suínos. A espécie *Microsporium canis*, coloniza cães e gatos domésticos, contaminando o ambiente domiciliar e favorecendo o aparecimento de infecções dermatofíticas nos indivíduos em contato com estes animais (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

As espécies antropofílicas são os agentes causadores de dermatofitoses mais frequentes, afetam seres humanos e raramente acometem outros animais ou conseguem sobreviver no solo. Entre eles, destacam-se *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton tonsurans* e *Epidermophyton floccosum* (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

Trichophyton rubrum é frequentemente associado a infecções crônicas e recorrentes, sendo responsável por uma variedade de condições, incluindo *Tinea corporis*, *Tinea pedis* e onicomicose (ELEWSKI, 1998). Sua prevalência é significativa em todo o mundo (OLSEVER *et al.* 2014), e estudos recentes têm destacado sua capacidade de se adaptar aos diferentes ambientes queratinizados, tornando-se um desafio clínico crescente por apresentar resistência considerável aos tratamentos antifúngicos convencionais (SIQUEIRA LEMOS *et al.* 2021).

Trichophyton interdigitale é frequentemente associado a infecções fúngicas cutâneas nos pés (*Tinea pedis*), causando uma variedade de sintomas, incluindo prurido, descamação e fissuras na pele afetada, impactando negativamente na qualidade de vida dos pacientes afetados (ILKIT; DURDU, 2015). Estudos epidemiológicos destacam a prevalência de infecções por esse dermatófito em todo o mundo, especialmente em áreas favoráveis à sua propagação, como instalações esportivas e piscinas públicas (FONSECA-GÓMEZ; URBANO-CÁCERES; ZANGUÑA-FONSECA, 2022).

Trichophyton tonsurans é um dos principais causadores de *Tinea capitis* especialmente em crianças. Esta espécie é altamente contagiosa e comumente transmitida por contato direto entre indivíduos infectados, especialmente em ambientes com aglomeração, como escolas e creches (ABDEL-RAHMAN *et al.* 2010).

Trichophyton equinum afeta principalmente equinos, causando a dermatofitose equina. Há também relatos ocasionais de infecções em humanos, especialmente em pessoas que têm contato próximo com esses animais (TAKATORI; ICHIJO, 1985). Esta espécie de fungo pode causar lesões cutâneas inflamatórias em equinos, resultando em perda de pelo, descamação e prurido. No entanto, em humanos são consideradas raras e geralmente autolimitadas (KANDEMIR *et al.* 2020).

Epidermophyton floccosum é reconhecido como um dos principais causadores de infecções cutâneas em humanos, especialmente *Tinea corporis* e *Tinea cruris* (BUNYARATAVEJ *et al.* 2024). Esta espécie possui a capacidade de colonizar a camada córnea da pele e causar lesões cutâneas inflamatórias, resultando em prurido, descamação e eritema (DE JESUS; SOUSA, 2020). É particularmente prevalente em regiões tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas favoráveis à sua propagação são comuns (ARUNA, 2023).

As espécies mais frequentemente encontradas foram organizadas em três grupos no quadro 1, conforme o habitat primário e afinidade por hospedeiros.

Quadro 1. Classificação de algumas espécies de dermatófitos conforme preferência

Geofílicos	Zoofílicos	Antropofílicos
<i>Microsporium boullardii</i>	<i>Microsporium canis</i>	<i>Epidermophyton floccosum</i>
<i>Microsporium cookei</i>	<i>Microsporium gallinae</i>	<i>Microsporium audouinii</i>
<i>Microsporium gypseum</i>	<i>Trichophyton equinum</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>
<i>Microsporium nanum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
	<i>Trichophyton verrucosum</i>	<i>Trichophyton tonsurans</i>

de hospedeiros. Fonte: Adaptado de WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995.

As principais espécies envolvidas em infecções de pele em humanos são: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium canis*, *Microsporium gallinae*, *Microsporium*

gypseum, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton soudanense*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton violaceum*, entre outros (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

Um estudo de Costa-Orlandi analisou 233 amostras de casos suspeitos de dermatomicose em um Hospital Terciário de Belo Horizonte. Foram obtidos isolados de leveduras e fungos filamentosos das espécimes e considerados diagnósticos conclusivos de micoses em 82 casos, sendo que o gênero *Trichophyton* representou mais de 80% dos isolados, com as espécies *T. rubrum*, *T. interdigitale*, além da espécie *M. gypseum* (COSTA-ORLANDI *et al.* 2012).

2.2.1 Fatores de patogenicidade

A patogenicidade dos dermatófitos envolve uma série de mecanismos adaptativos que lhes permitem colonizar e causar infecção na pele, cabelos e unhas dos hospedeiros humanos. Esses fungos possuem enzimas queratinolíticas, que lhes permitem degradar a queratina, uma proteína encontrada em abundância nos tecidos cutâneos, facilitando assim sua invasão e colonização (GHANNOUM *et al.* 2016).

A capacidade dos dermatófitos de metabolizar a queratina é considerada um fator de virulência, isto porque esses fungos secretam diversas enzimas (proteases, lipases e celulasas) que atuam como antígenos e induzem vários graus de inflamação, permitindo a captação de diferentes nutrientes presentes no microambiente hospedeiro e conseqüentemente, a sobrevivência do fungo no tecido hospedeiro (CHINNAPUN, 2015).

Os dermatófitos são capazes de digerir queratina por meio da quebra das ligações dissulfeto e a utilizam como fonte de carbono e nitrogênio (VIANI *et al.* 2001). O estudo de Grumbt e colaboradores oferece suporte molecular para a hipótese de que a degradação da queratina é facilitada pela degradação do agente redutor sulfito, que cliva ligações de cistina estabilizadoras, produzido por dermatófitos. Assim sendo, esse estudo mostra achados *in vitro* que integra dois pré-requisitos para a infecção de estruturas queratinizadas por dermatófitos: formação de sulfito para degradação de queratina e tolerância à cisteína (GRUMBT *et al.* 2013).

Mercer e Stewart demonstraram a complexidade envolvida na degradação de queratina por dermatófitos, que envolve a sulfitolise a partir da cisteína, a proteólise

por endoproteases e a hidrólise por exoproteases, permitindo a infecção de tecidos queratinizados (MERCER e STEWART, 2019). Maranhão e colaboradores em 2009 identificaram e analisaram genes que contribuem com o processo infeccioso causado por dermatófitos, e demonstraram que a deleção do gene *TruMDR2*, o qual possui sequência para codificar uma proteína transportadora de ligação de ATP, resulta em maior suscetibilidade a alguns antifúngicos. Além disso, verificou-se que esse gene é regulado positivamente na presença de queratina se comparado com a glicose (MARANHÃO *et al.* 2009).

Os dermatófitos também são capazes de produzir metabólitos secundários com propriedades imunomodulatórias que podem interferir com a resposta imune do hospedeiro, permitindo a persistência da infecção (BITENCOURT *et al.* 2021). Esses metabólitos podem influenciar tanto a resposta imune inata quanto adaptativa, afetando a virulência e a persistência da infecção fúngica. Estudos têm demonstrado que esses fungos são capazes de secretar proteínas e outras moléculas como o ácido hialurônico e o ergosterol, que podem modular a resposta inflamatória e a ativação de células do sistema imune, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (PETRUCELLI *et al.* 2018). Além disso, alguns metabólitos secundários produzidos pelos dermatófitos podem influenciar a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, contribuindo para a tolerância imunológica do fungo (BITENCOURT *et al.* 2021). Compreender o papel desses metabólitos secundários na patogênese da dermatofitose é crucial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes para o tratamento dessa infecção fúngica cutânea.

Outros estudos têm revelado a presença de genes de virulência específicos nos dermatófitos, os quais desempenham papéis importantes na aderência, na invasão e na evasão do sistema imunológico do hospedeiro. Esses genes de virulência dos dermatófitos codificam proteínas de adesão, como a adesina de superfície e a proteína de ligação, a fibronectina, que facilitam a ligação dos fungos aos queratinócitos da pele (MARTINEZ-ROSSI *et al.* 2017). Por fim, os genes que regulam a expressão de fatores de virulência e a resposta imune do hospedeiro, como genes de reguladores de transcrição e genes de moduladores da resposta inflamatória, desempenham papel na capacidade dos fungos dermatófitos de evadir o sistema imunológico do hospedeiro e assim persistir na pele (PERES *et al.* 2010).

A fim de buscar novos agentes antifúngicos e estratégias terapêuticas, alguns pesquisadores estudaram a regulação gênica em diversos aspectos, entre eles o fator

de transcrição StuA, exclusivo de fungos dermatófitos, que afeta a virulência, fisiologia, reprodução sexuada e produção de hifas quando eliminado (MARTINEZ-ROSSI *et al.* 2021). O fator de transcrição StuA pertence a uma classe conservada de proteínas exclusivas de fungos e está envolvido no controle da diferenciação e desenvolvimento celular fúngico. Estudos recentes revelaram que o gene *stuA* está diretamente envolvido na regulação da morfogênese, germinação, conidiação, pigmentação, hidrofobicidade micelial e suscetibilidade a diferentes estressores, além de confirmar o seu papel no metabolismo central do carbono relacionado à glicólise. Além disso, a deleção do gene *stuA* ocasionou a diminuição da atividade das proteases queratinolíticas, prejudicou a produção de biofilme e promoveu a secreção de citocinas pró-inflamatórias em uma linhagem celular de queratinócitos humanos. Assim, a função de StuA no metabolismo central é fundamental para a compreensão da fisiologia celular e das características de virulência, no intuito de elucidar os mecanismos moleculares subjacentes à patogênese da dermatofitose (BITENCOURT *et al.* 2021).

O fator de transcrição AP1 é uma proteína de ligação ao DNA presente em fungos dermatófitos que desempenha um papel central na regulação da expressão gênica e na adaptação desses microrganismos ao ambiente cutâneo do hospedeiro humano. Estudos de Peres e colaboradores têm demonstrado que a deleção do fator AP1 acarretou a hiperpigmentação, espessamento da parede celular dos conídios, aumento da suscetibilidade ao estressor de parede celular calcofluor e perda de controle da atividade queratinolítica. Além disso, esse fator de transcrição está envolvido no controle negativo dos mecanismos de virulência, o qual pode contribuir para a cronicidade da infecção, na resposta ao estresse oxidativo e à exposição a agentes antifúngicos, colaborando com a sobrevivência dos dermatófitos em condições adversas (PERES *et al.* 2022).

2.2.2 Mecanismos de resistência

Os dermatófitos têm apresentado uma crescente capacidade de desenvolver resistência aos antifúngicos, evidenciando um desafio no tratamento das dermatofitoses. Vários mecanismos de resistência têm sido identificados e relatados no intuito de compreendê-los, e assim permitir a aplicação das melhores estratégias terapêuticas, bem como o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

Os mecanismos de resistência aos antifúngicos podem ser: intrínsecos aos dermatófitos pela presença de variantes genéticas que conferem resistência aos antifúngicos ou a expressão naturalmente alta de genes de resistência; ou adquiridos pela exposição repetida aos antifúngicos, envolvendo a seleção de variantes genéticas resistentes durante o tratamento ou a ativação de vias de resistência em resposta ao estresse antifúngico. Ambas as formas são preocupantes devido à sua capacidade de comprometer a eficácia dos tratamentos antifúngicos convencionais (REVIE *et al.* 2018).

Dentre os mecanismos de resistência relatados, estão:

I. As alterações na expressão de genes relacionados à síntese de ergosterol:

A resistência dos dermatófitos aos azóis tem sido associada a alterações na expressão de genes relacionados à síntese de ergosterol, um componente essencial da membrana celular fúngica. Estudos têm demonstrado que a regulação positiva do gene CYP51 que codifica a enzima lanosterol 14- α -desmetilase pode conferir tal resistência. Além disso, mutações no gene ZCF51 que regula a expressão de CYP51, também foram implicadas na resistência aos azóis em dermatófitos (MARTINEZ-ROSSI *et al.* 2018).

II. As mutações em alvos antifúngicos:

As mutações nos genes que codificam a enzima lanosterol 14- α -desmetilase alvo dos azóis, podem levar à redução da afinidade do fármaco pelo sítio de ligação, resultando em uma menor eficácia terapêutica. Essas mutações podem surgir como resultado da pressão seletiva exercida pelo uso repetido de antifúngicos e podem se espalhar rapidamente entre os dermatófitos (MARTINEZ-ROSSI *et al.* 2018).

III. A superexpressão de bombas de efluxo transmembrana:

As bombas de efluxo são proteínas de transporte que removem ativamente os antifúngicos da célula, impedindo seu acúmulo intracelular em níveis tóxicos. Um exemplo é a família das proteínas transportadoras ABC (*ATP-binding cassette*), que utiliza ATP para transportar substratos através da membrana celular. A superexpressão do gene MDR1, que codifica essas bombas de efluxo, pode conferir resistência aos azóis em dermatófitos e pode ser induzida pela exposição repetida aos antifúngicos, resultando em uma diminuição da eficácia do tratamento. Além disso, essa superexpressão pode estar associada a alteração da composição lipídica da membrana celular (MARTINEZ-ROSSI *et al.* 2018).

IV. Regulação positiva de vias de sinalização em resposta ao estresse:

Os dermatófitos expostos a estresse, como a presença de antifúngicos, podem ativar vias de sinalização específicas que promovem a sobrevivência e resistência celular. Por exemplo, a ativação da via de sinalização MAP quinase (*mitogen-activated protein kinase*), a qual atua na regulação de respostas celulares ao estresse, sintetizando proteínas de choque térmico e ativando os genes de resistência, tem sido associada à resistência aos azóis em dermatófitos. Estudos têm mostrado que a regulação positiva dessas vias de sinalização pode levar à expressão aumentada de genes envolvidos na resistência aos antifúngicos, conferindo assim uma vantagem adaptativa aos dermatófitos (MARTINEZ-ROSSI *et al.* 2018).

V. Enzimas de detoxificação celular:

As enzimas de detoxificação, como a citocromo P450 (CYPs), têm a capacidade de metabolizar e inativar os antifúngicos da classe dos azóis, reduzindo assim sua eficácia terapêutica. Em dermatófitos, a superexpressão de genes que codificam as CYPs pode ser induzida pela exposição repetida aos antifúngicos, resultando em uma capacidade aumentada de metabolizar e inativar esses fármacos. Além disso, as CYPs podem estar envolvidas na ativação de pró-fármacos em dermatófitos, conferindo uma vantagem adaptativa aos fungos (MARTINEZ-ROSSI *et al.* 2018).

2.3 MODELOS DE INFECÇÃO

Os modelos de infecção para dermatófitos são utilizados na pesquisa por oferecerem um ambiente controlado que simula as condições fisiológicas do hospedeiro humano, proporcionando uma maior compreensão dos mecanismos de patogenicidade dos dermatófitos, incluindo sua capacidade de adesão, invasão e evasão do sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, os modelos de infecção são valiosos para avaliar a eficácia de tratamentos existentes, possibilitar o teste de novas estratégias terapêuticas, investigar os mecanismos de resistência antifúngica e identificar alvos terapêuticos potenciais (PERES *et al.* 2010).

Os estudos sobre a interação dermatófito-hospedeiro apresentam limitações devido aos modelos disponíveis e às características de cada espécie patogênica. Em alguns casos, a avaliação da infecção *in vivo* utilizando espécies zoofílicas de

dermatófitos cursa com cura espontânea ou então não acontece a colonização dos modelos pelas espécies antropofílicas (WHITE *et al.* 2008).

Os modelos de infecção possibilitam retratar os acontecimentos durante a infecção e são utilizados como um recurso para compreender o mecanismo envolvidos na patogênese das dermatofitoses, esclarecer os mecanismos relacionados à interação dermatófito-hospedeiro e avaliar a eficácia de novas estratégias terapêuticas.

O dermatófito *T. rubrum* pode interagir com amebas de vida livre no ambiente, e assim pode funcionar como um modelo alternativo para conhecer a interação existente entre os fungos e células fagocíticas (DE FARIA *et al.* 2020). Os modelos de infecção utilizando amebas fornecem uma alternativa ética e economicamente viável aos modelos animais tradicionais, disponibilizam um método de triagem para identificar novos agentes antifúngicos, permitem avaliar a eficácia de tratamentos existentes e compreender os mecanismos de virulência e de resistência antifúngica dos dermatófitos (RIZZO *et al.* 2017).

A utilização de pele suína explantada surgiu como um modelo de infecção por dermatófitos por se mostrar útil no estudo dos estágios iniciais da infecção e demonstrar que o crescimento fúngico depende da presença da pele e a adesão dos conídios depende do tempo de exposição (HO *et al.* 2020).

Para avaliar se desafios ambientais, tais como interação de *T. rubrum* com unhas e pele humanas, são capazes de interferir na adequação de genes de referência utilizados para a quantificação da expressão gênica por meio de amplificações de PCR em tempo real, um estudo utilizou excertos de pele humana obtidos de pacientes submetidos à cirurgia abdominal e fragmentos de unhas coletados de indivíduos saudáveis. (JACOB *et al.* 2012).

Outro estudo teve o objetivo de comparar o perfil de expressão dos genes de *T. rubrum* que codificam fatores de virulência putativos em modelos de infecção *ex vivo* e *in vitro*. Nesse trabalho, houve extenso crescimento de hifas nos fragmentos de unhas (*ex vivo*), mostrando assim diversos elementos da adesão, germinação e penetração do fungo na epiderme. Já o co-cultivo dos conídios com fibroblastos *in vitro* teve um crescimento expressivo do fungo, apesar de poucas hifas se manterem ligadas às células (PERES *et al.* 2016).

As vesículas extracelulares do dermatófito *T. interdigitale* são capazes de induzir a produção de mediadores pró-inflamatórios por macrófagos derivados das

medula óssea e queratinócitos de forma dose-dependente, além de aumentarem a atividade fungicida daquelas células. O estudo desse mecanismo de transporte de biomoléculas foi realizado em macrófagos por serem um modelo de células hospedeiras para a investigação das funções imunológicas (BITENCOURT *et al.* 2018).

A investigação dos mecanismos envolvidos em diferentes infecções ecológicas por dermatófitos antropofílicos e geofílicos também foi avaliada utilizando um modelo com células HaCaT (linhagem celular de queratinócitos imortais aneuploides da pele humana adulta). Após a infecção foi observado que a expressão de diferentes genes pode oferecer informações de como os queratinócitos respondem a esses fungos. Além disso, a expressão gênica diferencial pode ser capaz de esclarecer as manifestações clínicas apresentadas por essas dermatofitoses (DENG *et al.* 2020).

Um estudo de revisão de Faway e colaboradores de 2018 concentrou os modelos acerca de equivalentes de pele humana, superando as limitações (diferenças na permanência do processo infeccioso e respostas teciduais que ocorrem *in vivo* e em modelos *in vitro*) e permitindo uma compreensão melhor da patogênese da dermatofitose. Foram utilizados para o cultivo de dermatófitos: suspensão de queratinócitos cornificados, fragmentos de camada cornificada isolados e pedaços de unhas e de cabelos. Para modelar a resposta epidérmica para detecção de citocinas e peptídeos antimicrobianos (AMPs) liberados, foram usados queratinócitos cultivados em monocamadas e neutrófilos. *In vivo*, foram explorados porquinhos da Índia e ratos, nos quais a extensão da resposta inflamatória varia a depender do hospedeiro e espécie de dermatófito (FAWAY *et al.* 2018).

2.3.1 Modelos vertebrados

O modelo mais utilizado para avaliar a virulência fúngica e resposta imune durante a infecção é o modelo de camundongo (CAMBIER *et al.* 2017). A compreensão dos mecanismos envolvidos na dermatofitose invasiva causada por *T. mentagrophytes* foi possível após a indução de uma infecção subcutânea em camundongos suíços adultos saudáveis. Ao estudar esse modelo de infecção, notou-se a rápida disseminação de fungos para os linfonodos poplíteos, baço, fígado e rins, além do desenvolvimento de uma inflamação aguda seguida de uma reação granulomatosa, assim como observado em humanos (VENTURINI *et al.* 2012).

Em 2014, um trabalho de Baltazar e colaboradores propôs desenvolver um modelo murino de dermatofitose causada por *T. rubrum* e assim avaliar o papel da interleucina-12 (IL-12) e interferon-gama (IFN- γ) no decorrer da doença. Foram utilizados camundongos de tipo selvagem e camundongos deficientes para IL-12 e IFN- γ para observar que a via da IL-12 que regula a produção de IFN- γ se mostrou importante para reduzir a carga fúngica por meio do estímulo da fabricação de interleucina-1 (IL-1) e explosão oxidativa do hospedeiro (BALTAZAR *et al.* 2014).

Entretanto, o uso de modelos murinos requer aprovação do comitê de ética para pesquisas que envolvam animais, além de que para o manejo desses animais é necessário um biotério específico, a compra, manutenção e alimentação dos camundongos são caras e o tempo de experimentação é demorado. A infecção de camundongos com dermatófitos antropofílicos não induz lesão, sendo difícil para analisar a eficácia de medicamentos.

Existem estudos recentes que demonstram semelhanças entre a resposta imunológica dérmica de porquinhos da Índia e humanos, justificando assim o seu uso como modelo experimental para entender a patogênese da dermatofitose e para avaliar a eficácia de antifúngicos (SONG *et al.* 2018.). Além disso, a anatomia cutânea desses animais possuem similaridades estruturais e de composição como a pele humana, o que acaba por permitir uma representação mais fidedigna das condições de infecção por dermatófitos e assim uma melhor interpretação dos mecanismos da doença (TREIBER; PITTERMANN; SCHUPPE, 2001).

2.3.2 Modelos invertebrados

Os modelos invertebrados vêm sendo sugeridos como uma alternativa mais viável para simular as condições de infecções em um sistema biológico (LI *et al.* 2013), uma vez que o valor das larvas é reduzido, bem como o trabalho durante o manejo e a alimentação das larvas. Além disso, o tempo de experimentação é menor e o local de armazenamento delas é mais fácil. Os invertebrados *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Galleria mellonella* têm sido usados como modelos experimentais alternativos para avaliar a patogênese de fungos, uma vez que apresentam características distintas para o entendimento das interações patogênicas nos hospedeiros (DE SOUZA *et al.* 2015).

A utilização da mosca *Drosophila melanogaster* como modelo para o estudo da dermatofitose surgiu como uma perspectiva promissora, uma vez que apresenta uma rápida reprodução, uma genética bem caracterizada e um sistema imunológico conservado, o que possibilita examinar eficientemente os mecanismos envolvidos na patogênese dessa infecção fúngica (LIONAKIS, 2011). Esse modelo experimental de infecção tem permitido a realização de ensaios de triagem em larga escala, possibilitando assim a identificação de novos potenciais compostos usados na terapêutica, bem como alvos moleculares para o tratamento das dermatofitoses (DA COSTA *et al.* 2023).

O estudo da dermatofitose usando o nematódeo *Caenorhabditis elegans* como modelo de infecção, tem se destacado devido a sua fácil manipulação, o seu curto ciclo de vida e a manutenção de genes relacionados à resposta imune. A sua utilização permite também a realização de ensaios de triagem de alto rendimento para indicar compostos terapêuticos para essa doença (AHAMEFULE *et al.* 2021).

O inseto da espécie *Galleria mellonella* vem sendo viabilizado como modelo de infecção por causa da sua resposta imunológica, a qual conta com a presença de hemócitos com atividade fagocítica frente a infecção conservada, bem como sua facilidade em administrar compostos antimicrobianos para testar a toxicidade e eficácia *in vivo* (TREVIJANO-CONTADOR; ZARAGOZA, 2014). A larva deste inseto, regularmente adotada nos estudos de patogenicidade, se mostrou uma opção atingível e ética frente aos modelos experimentais animais tradicionais, além de possibilitar a análise de distintos aspectos da interação entre o hospedeiro e os dermatófitos (LIONAKIS, 2011).

A infecção de *G. mellonella* por dermatófitos não é adequada para desenvolver um modelo de dermatofitose superficial, dada a baixa virulência desses fungos quando injetados nas larvas (CAMBIER *et al.* 2017).

Pensando nisso, a escolha de *Tenebrio molitor* como um modelo alternativo para infecção de dermatófitos foi feita porque não requer envio de proposta de pesquisa para uso das larvas para Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) para aprovação e liberação. Além disso, a composição das larvas são: 53,6% umidade, 17,9% proteínas, 6,1% lipídios, 0,9% cinza (minerais) e fibra na forma de quitina, a qual está presente no exoesqueleto desse inseto e varia de acordo com o estágio de vida em que se encontra (SILVA *et al.* 2021).

O manejo de *T. molitor* em laboratório requer adotar um conjunto de cuidados a fim de garantir o mínimo bem-estar das larvas e a integridade dos experimentos. No laboratório é crucial manter algumas condições ambientais adequadas, como temperatura em torno de 25-27°C e umidade relativa em torno de no mínimo 40% (ORSOLIN et al. 2018). A alimentação pode ser feita utilizando cereais e derivados, tais como farelo de trigo, aveia, milho e cevada, com o intuito de promover o desenvolvimento saudável dos insetos (ASBRACI, 2021). Já a hidratação pode ser fornecida por meio de algodão umedecido, cenoura, abobrinha, chuchu ou maçã (LOZOYA-PÉREZ et al. 2021; SPANG, 2013).

O estudo das dermatofitoses utilizando as larvas de *T. molitor* como modelo experimental de infecção oferece as seguintes vantagens: a manipulação e manutenção dessas larvas no laboratório são relativamente simples e de baixo custo, permitindo a realização de experimentos com certa facilidade (MAGALHÃES et al. 2021).

A utilização de larvas de *T. molitor* é mais vantajosa por poder ser mantida em temperaturas entre 25 °C e 37 °C, permitindo o estudo de patógenos à temperatura corporal. Além disso, são comercializadas no Brasil, possuem um cultivo em laboratório mais rápido e a forma de inoculação do patógeno pode ser por injeção, resultando em uma maior precisão quanto ao número de microrganismos inseridos nos hospedeiros (DE SOUZA et al. 2015).

Entretanto, a aplicação de *T. molitor* como modelo experimental para infecções por dermatófitos apresenta algumas limitações, tais como: sua anatomia, fisiologia e sistema imunológico diferem significativamente das características humanas, delimitando os resultados obtidos para a prática clínica, além de requerer uma padronização por se tratar de uma metodologia recente.

T. molitor é um besouro pertencente à ordem Coleoptera e à família Tenebrionidae, o qual apresenta um ciclo de vida variável de 280 a 630 dias com metamorfose completa composto por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. Podem ser postos 500 ovos de formato ovais e alongados, em média. As larvas eclodem com aproximadamente 12 dias e são de coloração esbranquiçada. Após alguns dias, um exoesqueleto quitinoso e amarelado é produzido, dando origem a larva adulta que pode durar 4 meses. Em seguida, ocorre a fase pupal com duração de até 9 dias que dará origem a fase adulta do inseto com expectativa de vida podendo chegar a até 4 meses (TAFAREL, 2022).

A imunidade adaptativa é ausente nos insetos. Entretanto, a imunidade inata é excepcionalmente desenvolvida e se divide em resposta imunológica celular e humoral (DUARTE, 2015). A resposta humoral está relacionada com a produção de peptídeos antimicrobianos, ROS, PRN e um complexo enzimático que controla a coagulação e a melanização da hemolinfa. Enquanto que a resposta celular está associada a fagocitose, nodulação e encapsulamento por hemócitos (LAVINE; STRAND, 2002).

Os hemócitos são células semelhantes aos macrófagos presentes na hemolinfa e que se originam de pró-hemócitos. Os pró-hemócitos, as chamadas células jovens, por sua vez, sofrem diferenciação em granulócitos, plasmatócitos, oenocitóides e esferulócitos. (DINIZ, 2016). Os granulócitos (apresentam grânulos) e plasmatócitos (pleomórficos) são os principais hemócitos relacionados com a fagocitose. Os oenocitóides são os maiores hemócitos imóveis que carregam a fenoxidase (responsável pelo escurecimento da hemolinfa por meio da síntese de melanina). Já os esferulócitos são células esféricas, não movem e com função desconhecida (DUARTE, 2015).

2.4 TRATAMENTO DAS DERMATOFITOSSES

O tratamento das dermatofitoses realizado por meio de terapias tópicas são seguras, capazes de tratar onicomicose de forma eficaz, não há potencial para interações medicamentosas e podem servir de apoio à terapêutica oral ou profilaxia (DALLA LANA *et al.* 2016). O fármaco, geralmente em forma de cremes, entra na lâmina ungueal pelas vias transungueal, subungueal e ungueal (GUPTA; STEC, 2019). A terapia dessas infecções também pode ser efetuada de forma sistêmica, em situações mais extensas, generalizadas, recorrentes, crônicas ou refratárias aos medicamentos de uso tópico. Nessas situações, os medicamentos utilizados são: terbinafina, griseofulvina, cetoconazol e fluconazol (DALLA LANA *et al.* 2016).

O tratamento, ainda, pode ser executado de maneira combinada pela associação de terapias tópicas e sistêmicas, visando a depuração fúngica, bem como a diminuição da resistência. Entretanto, a terapia medicamentosa é longa e pode

desencadear alguns efeitos adversos, contribuindo para a não continuidade do tratamento, recaídas e infecções recalcitrantes (MARTINEZ-ROSSI *et al.* 2021).

De maneira geral, os antifúngicos utilizados contra dermatofitoses pertencem às classes das alilaminas, polienos, azólicos, equinocandinas, e outros, como a griseofulvina e flucitosina (BADALI *et al.* 2015). O emprego desses medicamentos é baseado na gravidade da doença e no quadro de saúde do paciente, tendo em vista que cada um deles apresenta um mecanismo de ação distinto contra dermatófitos.

Os fármacos da classe das alilaminas possuem atividade fungicida, a qual contribui para uma alta eficácia clínica e uma baixa toxicidade, além de inibirem a biossíntese de ergosterol, um componente essencial das membranas celulares dos fungos. As alilaminas interferem na função da membrana plasmática fúngica, uma vez que são capazes de inibir a enzima esqualeno epoxidase, causando acúmulo de uma substância tóxica para o fungo (KHURANA *et al.* 2019).

A terbinafina, uma representante da classe das alilaminas, afeta a biossíntese do ergosterol por impedir a conversão de esqualeno em lanosterol, por meio da inibição da esqualeno epoxidase codificada pelo gene ErgA (PERES *et al.* 2010). Esse fármaco é absorvido pelo trato gastrointestinal, com biodisponibilidade de 70-80% e pico de concentração plasmática de 2 horas aproximadamente. Apresenta também a capacidade de se ligar às proteínas plasmáticas e às células sanguíneas, alcançando a pele e suas estruturas, e quando o tratamento finaliza, a concentração permanece por até oito semanas (DEL PALACIO *et al.* 2000).

Os polienos são capazes de criar poros na membrana celular fúngica por meio de ligações ao ergosterol presente nas membranas fúngicas, comprometendo sua integridade e permeabilidade seletiva. Dessa forma, os fungos acabam por perder íons e nutrientes essenciais para sua sobrevivência (MARTINEZ-ROSSI *et al.* 2021). A anfotericina B é um polieno macrocíclico utilizado no tratamento de infecções fúngicas graves e sistêmicas, com amplo espectro de ação e eficácia. O mecanismo de ação deste antifúngico está relacionado a ligação aos esteróis presentes na membrana dos fungos, formando pequenos poros que comprometem a sua funcionalidade e levam à morte celular. Além disso, essa droga apresenta potente efeito imunomodulador, com ação pró-inflamatória (FALCI e PASQUALOTTO, 2015).

As drogas azólicas possuem atividade fungistática e são capazes de inibir a enzima 14- α -desmetilase pertencente ao citocromo P450, também essencial na síntese do ergosterol, prejudicando a função das membranas fúngicas (KHURANA *et*

al. 2019). O uso clínico de antifúngicos orais azólicos para o tratamento de infecções fúngicas cutâneas causadas por dermatófitos envolve, principalmente, os antifúngicos triazólicos: itraconazol e fluconazol.

O itraconazol é um agente triazólico, pouco solúvel em água, que tem sua ação potencializada quando ingerido após uma refeição gordurosa, sendo que a absorção é dose-dependente. Atinge altas concentrações que persistem até um mês após o fim do tratamento em tecidos gordurosos, cervicais, na pele e nas unhas, entretanto o acúmulo na pele é lento. Possui meia-vida de excreção de 20 a 60 horas, o que sugere que as concentrações de equilíbrio são alcançadas após duas semanas de uso continuado (DEL PALACIO *et al.* 2000).

O fluconazol é um triazol solúvel em água, com ótima absorção e sua biodisponibilidade parece não alterar após ingestão de alimentos, variação de pH ou uso de antiácidos. Esse medicamento é distribuído por todo o corpo, possui meia-vida de 22 a 30 horas e atinge o estado de equilíbrio de 6 a 10 dias após o início do tratamento (DEL PALACIO *et al.* 2000).

Já os tiazólicos ou 1,3-tiazol possuem um anel não heterocíclico com um átomo de enxofre e outro de nitrogênio (NIH, PubChem, 2022). Esses antifúngicos apresentam atividades anti-inflamatórias (SINHA; DOBLE; MANJU, 2018) e antimicrobianas (ALTHAGAFI; EL-METWALY; FARGHALY, 2019). Um estudo recente demonstrou ação antifúngica desses compostos ao interferirem no sistema antioxidante aumentando o estresse oxidativo intracelular de leveduras do gênero *Cryptococcus spp*, (SÁ *et al.* 2017). Em outro estudo, foi observado uma redução no biofilme e na espessura capsular, evidenciando a influência na virulência dos fungos provocada pelos triazóis (DE SÁ *et al.* 2019). Assim, os derivados tiazólicos apresentam uma atividade antifúngica promissora e podem ser estudados para essa finalidade.

As equinocandinas são lipopeptídeos sinteticamente modificados que atuam inibindo a síntese de β -glucano, um componente essencial para a integridade da parede celular dos fungos. Como o alvo desses fármacos é o complexo β -1,3-D-glucano sintetase, acaba levando ao colapso osmótico e consequente lise celular (DIOMEDI *et al.* 2004).

A caspofungina, o principal representante dessa classe, é utilizada no tratamento de infecções fúngicas invasivas em pacientes imunocomprometidos, por apresentar toxicidade seletiva e interações farmacológicas mínimas. Esse fármaco se

mostrou eficaz em pacientes refratários a outros agentes antifúngicos, tornando-se uma opção terapêutica importante em casos de resistência. Além disso, esse medicamento apresenta segurança e eficácia documentadas em diversas populações de pacientes, contribuindo para sua aceitação como parte da terapia contra infecções fúngicas graves (LAUTERT *et al.* 2011).

A micafungina também pertence à classe das equinocandinas e vem sendo amplamente utilizada no tratamento de infecções fúngicas invasivas. Seu mecanismo de ação provoca a instabilidade e ruptura da membrana celular fúngica, resultando na morte fúngica. Por causa da eficácia, segurança e falta de interações medicamentosas da micafungina, ela tem sido empregada profilaticamente em pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoéticas e em pacientes cirúrgicos de alto risco para prevenir infecções fúngicas. No entanto, este fármaco apresenta alguns efeitos adversos, como reações no local da injeção, distúrbios gastrointestinais e elevações transitórias das enzimas hepáticas, necessitando o monitoramento dos pacientes durante o tratamento (CATALÁN-GONZÁLEZ; MONTEJO-GONZÁLEZ, 2009).

A Hsp90 (*Heat Shock Protein 90*) pode ser um alvo para terapia antifúngica porque está ligada à patogênese fúngica, uma vez que alguns fungos são capazes de produzir essas proteínas em resposta a condições tóxicas (KESHWANIA *et al.* 2023). A Hsp90 é uma chaperona molecular altamente conservada e essencial para a sobrevivência celular em eucariotos, uma vez que atua na regulação da estabilidade, dobramento e ativação de várias proteínas envolvidas na sinalização celular, regulação do ciclo celular e resposta ao estresse. Essa proteína é única, já que requer a hidrólise de ATP para exercer suas funções corretamente e está envolvida em várias vias de sinalização celular que são afetadas em doenças, tornando-a um alvo terapêutico promissor. Estudos recentes têm destacado o papel da Hsp90 na manutenção da homeostase proteica e na resposta ao estresse celular, contribuindo para uma melhor compreensão de sua relevância biológica e potencial terapêutico (NECKERS; WORKMAN, 2012).

A Hsp90 está aumentada em condições de estresse e alguns microrganismos são capazes de produzir compostos naturais que inibem a ação da Hsp90 ATPase, que possui papel na patogenicidade de *T. rubrum*. A inibição química de Hsp90 resulta no aumento da suscetibilidade desse fungo ao itraconazol e micafungina, indicando um potencial alvo para a terapia de combinação com antifúngicos (MARTINEZ-ROSSI *et al.* 2017).

A griseofulvina é um fármaco que age na inibição da mitose dos dermatófitos, através da ligação às proteínas microtubulares fúngicas, impedindo a polimerização dos microtúbulos (RUBENICK *et al.* 2013). Além disso, esse medicamento possui elevada eficácia, excelente perfil de segurança, interação medicamentosa com poucos medicamentos e baixo custo (CRUZ *et al.* 2011). Esse antifúngico tem sido amplamente utilizado para o tratamento de infecções fúngicas da pele, cabelo e unhas, apesar de estar associada a efeitos colaterais adversos, tais como distúrbios gastrointestinais, erupções cutâneas e reações de fotossensibilidade (DEL PALACIO *et al.* 2000).

O agente antifúngico flucitosina, também conhecido com 5-fluorocitosina, age interferindo na síntese de proteínas e ácidos nucleicos fúngicos essenciais, provocando alterações no crescimento, na divisão celular e na replicação dos fungos, através da sua conversão em 5-fluorouracil pela enzima citosina desaminase. Essa droga pode ser administrada por via oral, é absorvida rapidamente pelo trato gastrointestinal e por esse motivo, é um agente antifúngico com maior especificidade e menor toxicidade para o tratamento das dermatofitoses (GHANNOUM, 2016). A flucitosina é frequentemente utilizada em combinação com outros antifúngicos, como a anfotericina B, para o tratamento de infecções fúngicas graves. No entanto, o uso da flucitosina pode estar associado ao desenvolvimento de resistência fúngica, ao surgimento de efeitos adversos, como toxicidade hematológica e hepática, exigindo monitoramento cuidadoso durante o tratamento (NOBRE *et al.* 2002).

A polioxina é um antifúngico que tem demonstrado eficácia contra dermatófitos, inclusive aquelas resistentes a outros agentes antifúngicos convencionais. Algumas pesquisas indicaram que a polioxina prejudica a síntese de quitina por meio da inibição da enzima quitina sintase, levando ao comprometimento do crescimento fúngico e, potencialmente, à redução da virulência (GEORGOPAPADAKOU; TKACZ, 1995).

A sordarina é um antifúngico com um mecanismo de ação específico, isto é, ela inibe a síntese de proteínas por meio da interferência na capacidade fúngica em traduzir o RNA mensageiro (RNAm) em proteínas funcionais, essenciais para o seu crescimento e sobrevivência. Assim, esse antifúngico é capaz de inibir seletivamente o crescimento de fungos ao bloquear essa etapa crucial da síntese proteica (VICENTE *et al.* 2009).

Os mecanismos de ação dos agentes antifúngicos e seus respectivos alvos previamente mencionados foram esquematizados na figura 2 (KESHWANIA *et al.* 2023).

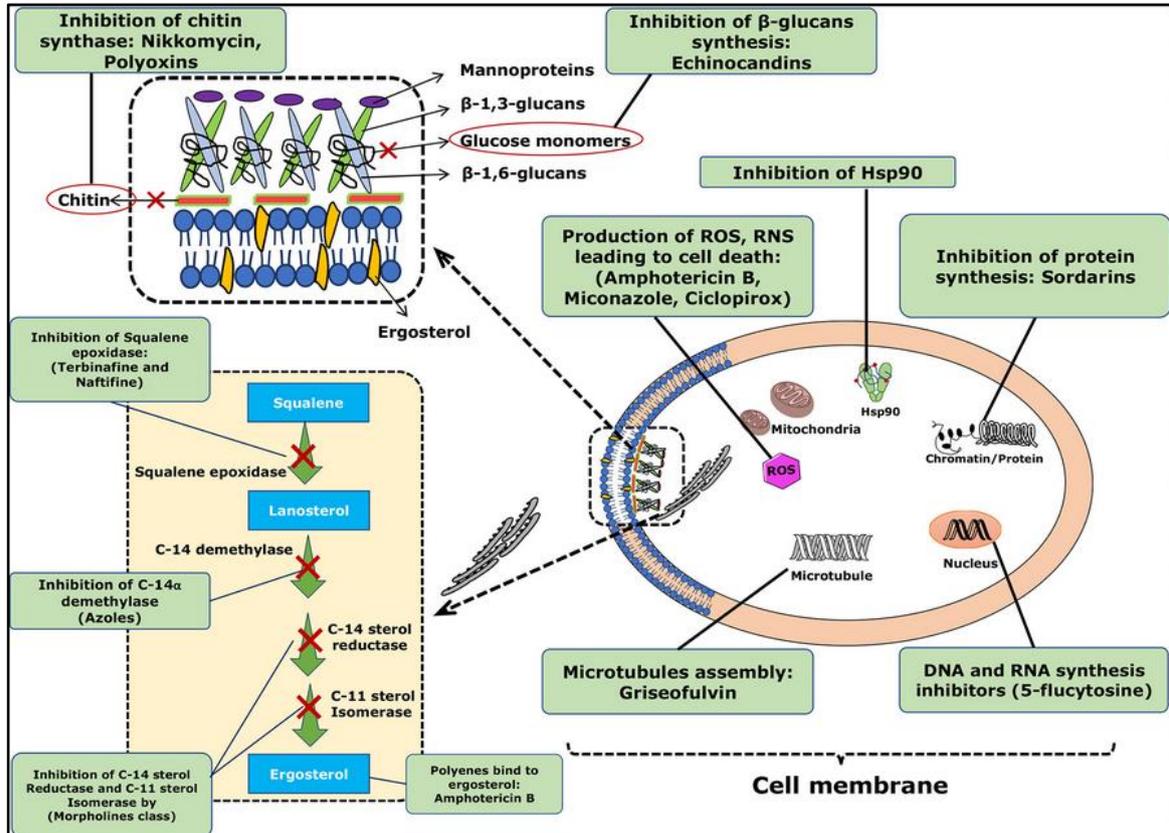


Figura 2. Esquema dos alvos e mecanismos de ação dos agentes antifúngicos. Fonte: KESHWANIA *et al.* 2023.

3 JUSTIFICATIVA

As infecções causadas por dermatófitos atingem cerca de 25% da população mundial, de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde. Além disso, estima-se que até 70% dos adultos sejam portadores assintomáticos desses microrganismos, podendo ser encontrados em diversas regiões do globo com variações de espécies (PERES *et al.* 2010). As dermatofitoses causam uma diminuição significativa na qualidade de vida dos pacientes, uma vez que afeta fatores psicológicos, econômicos e sociais que se relacionam com ansiedade, depressão e baixa auto estima por questões estéticas. Ademais, tal infecção pode se tornar invasiva em pacientes imunocomprometidos ou predispostos (MARTINEZ-ROSSI *et al.* 2021).

Nesse contexto, novos compostos com atividade anti dermatófitos são essenciais, uma vez que existem relatos de linhagens resistentes às drogas atualmente disponíveis. Além disso, a busca por modelos experimentais que possam fornecer uma compreensão mais abrangente dos mecanismos de virulência dos dermatófitos e da eficácia de tratamentos antifúngicos é essencial (DE SOUZA *et al.* 2015). Nesse sentido, *T. molitor* tem surgido como um promissor candidato para preencher essa lacuna devido à sua capacidade de mimetizar características da dermatofitose e à sua resposta imunológica comparável à de mamíferos (MAGALHÃES *et al.* 2021). No entanto, existe uma lacuna substancial na literatura científica em relação à avaliação específica de *T. molitor* como modelo para estudar a dermatofitose, entender melhor a patogênese da doença e testar antifúngicos, possibilitando assim a investigação do seu potencial como modelo.

Assim, a hipótese desse trabalho é que novos compostos tiazólicos apresentam atividade contra diferentes espécies de dermatófitos, representando uma nova estratégia terapêutica. O desenvolvimento de um modelo experimental robusto de infecção em larvas de *T. molitor* possibilitará a avaliação do processo infeccioso causado por dermatófitos, seu potencial patogênico e a eficácia de drogas com efeito antifúngico, como os tiazóis. Esses estudos podem gerar dados importantes para novas abordagens profiláticas e terapêuticas, além de promover benefícios tanto à saúde pública quanto à qualidade de vida dos pacientes afetados por essa condição dermatológica prevalente.

4 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade de compostos tiazólicos em dermatófitos e desenvolver um modelo de infecção por dermatófitos em larvas de *T. molitor* para testar esses compostos.

Com o propósito de simplificar a leitura do documento, o presente trabalho foi subdividido em dois capítulos. No primeiro capítulo, será abordada a avaliação da atividade dos 53 compostos tiazólicos em dermatófitos. Já no segundo capítulo, serão contemplados os aspectos relativos à caracterização do modelo alternativo de infecção utilizando *T. molitor*. Os objetivos específicos de cada capítulo serão apresentados em suas respectivas seções.

CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS TIAZÓLICOS EM DERMATÓFITOS

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade de 53 novos compostos tiazólicos fornecidos pela Professora Dra. Renata Barbosa de Oliveira da Faculdade de Farmácia da UFMG contra *T. rubrum*.
- Avaliar a atividade dos compostos que apresentarem ação contra *T. rubrum* para outros dermatófitos, como *T. interdigitale*, *T. tonsurans*, *T. equinum*.
- Avaliar a atividade fungicida e fungistática em *T. rubrum* dos 53 compostos.
- Avaliar a ação de compostos selecionados em modelo de infecção *in vitro* de unhas humanas e de exoesqueletos de *T. molitor* por *T. rubrum*.
- Avaliar a ação dos novos compostos azólicos no biofilme maduro e na maturação do biofilme de *T. rubrum*.
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxinitrito (PRN) em *T. rubrum* na presença dos compostos selecionados.
- Avaliar o estresse osmótico, de parede celular, de retículo endoplasmático e agente desnaturante de proteínas em *T. rubrum* após exposição aos compostos selecionados.

5 METODOLOGIA

5.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas espécies 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). Além disso, todas as espécies utilizadas nesse estudo possuem genoma sequenciado, de acordo com trabalho de Martinez e colaboradores (MARTINEZ *et al.* 2012).

Inicialmente, foi avaliada a ação dos compostos tiazólicos em *T. rubrum* (CBS118892), por ser o dermatófito antropofílico mais comum em micoses em humanos. Em seguida, foi analisado também para os dermatófitos, *Trichophyton interdigitale* (H6, ATCC MYA3801), *Trichophyton tonsurans* (CBS112818) e *Trichophyton equinum* (CBS127.97).

5.2 MEIOS DE CULTURA

As espécies de dermatófitos foram cultivadas em placas de Petri 90x15 contendo meios Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), Ágar Batata Dextrose (ABD) e Ágar Extrato de Malte (AEM), pH 5,6. Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos, pelo método de microdiluição em meio sólido, foi utilizado o meio ASD. Para a determinação da CIM por microdiluição em caldo, foi utilizado o meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), pH 7,0 e tamponado com ácido morfolino-propano-sulfônico (MOPS) 0,165 M (CLSI, 2012). A avaliação da ação fungicida e fungistática foi realizada em placas de Petri contendo ASD.

Para os testes de estresse, foi utilizado ASD com os estressores Cloreto de Sódio (NaCl 0,5M), Cloreto de Potássio (KCl 0,5M), Calcofluor (CFLU) 50 µg/mL, Vermelho Congo (VC) 50µg/mL, DL-Ditiotreitol (DTT 0,05%) e Dodecilsulfato (SDS 0,05%). Para infecção *in vitro* de fragmentos de unhas e de exoesqueletos de *T. molitor* foram utilizados o meio ágar água (AA). Para a quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxinitrito (PRN) foi utilizado o meio RPMI 1640 sem fenol.

5.3 PREPARO DO INÓCULO

Para os experimentos a seguir, foram utilizados dois inóculos distintos: fragmentos de micélios retirados diretamente da placa de Petri e suspensão de conídios, a qual foi obtida por meio de raspagem do fungo cultivado por 21 dias a 28 °C, em placas de AEM, em salina 0,9% esterilizada e filtrada em lã de vidro. A concentração dos microconídios foi estimada por contagem em câmara de Neubauer.

5.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos 53 compostos tiazólicos, foi inicialmente realizada para *T. rubrum*, por dois métodos: microdiluição em meio sólido, utilizando o meio ASD e microdiluição em caldo com o meio RPMI.

O método de microdiluição em meio sólido ASD foi realizado em placas de 48 poços, com dois inóculos diferentes: micélios e suspensão de conídios e o controle do experimento foi realizado na primeira coluna de cada placa. Para o primeiro inóculo, foram utilizados os micélios crescidos previamente em placas de Petri com AEM. Para o segundo inóculo, foi utilizada uma suspensão de conídios contendo $1,0 \times 10^5$ conídios/mL.

O primeiro teste de triagem de ação dos compostos foi executado com os micélios e consistiu em colocar 800 µL de meio ASD sem (controle) e com diferentes concentrações dos compostos (100µg/mL, 75µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL, 10µg/mL, 8µg/mL, 5µg/mL, 3µg/mL e 2µg/mL), em cada poço da placa, juntamente com um fragmento de micélio. O teste seguinte foi realizado inoculando 5 µL de uma suspensão de conídios contendo $1,0 \times 10^5$ conídios/mL. Em seguida, as placas foram incubadas a 28 °C por 5 dias e, posteriormente, observadas e comparadas em relação ao crescimento fúngico nas placas.

De posse dos resultados, esse teste de drogas em meio sólido também foi realizado, nos mesmos moldes e com apenas 06 compostos, para os seguintes dermatófitos: *T. interdigitale*, *T. tonsurans* e *T. equinum*.

O método de microdiluição em caldo em meio RPMI foi realizado em placas de 96 poços com apenas um inóculo (suspensão de conídios) e os controles do experimento foram colocados na primeira e na última colunas de cada placa, de acordo com o protocolo estabelecido pelo CLSI, documento M38A para fungos filamentosos.

No experimento, o controle de esterilidade foi realizado com apenas 200 μL de meio RPMI sem inóculo e o controle de crescimento feito com 100 μL de meio RPMI e 100 μL de suspensão de conídios também contendo $1,0 \times 10^5$ conídios/mL. Nas demais colunas foi adicionado 100 μL de meio RPMI contendo uma diluição seriada iniciada com 60 $\mu\text{g/mL}$ das drogas e 100 μL de uma suspensão de conídios. As placas foram incubadas a 28 °C por 5 dias e o crescimento do fungo foi observado por meio da turvação do meio de cultivo.

O quadro 2 apresenta os 53 compostos, cada um recebeu uma numeração (01 ao 53) que será utilizada de agora em diante para identificar e se referir a eles.

Quadro 2: Identificação dos compostos avaliados neste estudo, cedidos pela Profa. Renata Oliveira.

Numeração	Identificação	Concentração da solução estoque dos compostos (mg/mL)
01	QC Bu	1,6
02	RJ40	1,4
03	RJ26	2
04	QNCNAc	1,5
05	QH2	1,1
06	FN5	1,7
07	RS17	1,24
08	PPP2	1,4
09	RI47	1,1
10	GNCGIh	1,2
11	RVJ20	1,6
12	RJ39	1,8
13	RJ38	1,8
14	IN2	1,5
15	RPB2	1,9
16	RJ12	1,9
17	IMOF	1,6
18	BFAD3d	1,6
19	RJ46	2,2

20	QNCGd	1,4
21	AF31	1,9
22	RVJ17	1,7
23	IN17	1,9
24	QNCGli	1,9
25	RI29	2
26	RS10	1,31
27	IN19	2
28	IN7	1,3
29	RVJ32	1,4
30	RS11	1,19
31	RS15	1,67
32	RVJ27	2,2
33	RPL19	1,75
34	RPB9	1,5
35	QOCMOF	1,4
36	AFF1	1,8
37	IBNH+	1,3
38	AFB1	1,7
39	QCOH	2
40	EANB	1,2
41	HI2	1,45
42	RVJ31	1,3
43	RVJ15	2,1
44	RPB1	1,4
45	RJ48	1,4
46	ClacMII	1,8
47	RS21	4,58
48	RJ42	2,5
49	RPL16	2,2
50	ICH+	1,9
51	RJ28	1,6
52	RVPOH 2HB4	2
53	RVP05.1	2

5.5 AÇÃO FUNGICIDA E FUNGISTÁTICA

A avaliação da atividade fungicida e fungistática dos 53 compostos azólicos foi realizada em 06 placas de Petri com ASD. Esse teste consistiu em adicionar, nessas placas 5 μ L da solução de cada poço das placas de microdiluição em caldo em meio RPMI no valor de CIM de cada uma das 53 drogas testadas, bem como de seus controles. A leitura visual foi realizada após 05 dias para avaliar as atividades fungicida ou fungistática de cada um dos compostos.

5.6 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO *in vitro* DE UNHA E DE EXOESQUELETO

A ação dos compostos foi avaliada em modelo de infecção *in vitro* por meio da avaliação do crescimento de *T. rubrum* em fragmentos de unhas humanas e de exoesqueleto de *T. molitor*. Esse experimento foi realizado em 04 placas de 12 poços, adicionando AA em todos os poços e uma suspensão de conídios contendo 5×10^5 con/mL. Os controles foram 04, sendo eles: os fragmentos de unhas e exoesqueletos com 10 μ L de água, com 10 μ L da suspensão de conídios e com 10 μ L da suspensão de conídios e 10 μ L de 02 concentrações diferentes - uma sub-inibitória e outra inibitória - do antifúngico Terbinafina (TER). Enquanto que nos testes, foram utilizados fragmentos de unha e exoesqueletos, 10 μ L da suspensão de conídios e 10 μ L dos 06 compostos azólicos também nessas 02 concentrações (sub-inibitória e inibitória). As placas foram incubadas a 28 °C por 20 dias e a leitura foi feita observando o crescimento fúngico após esse período.

5.7 AÇÃO DOS COMPOSTOS NO BIOFILME MADURO

Alguns compostos tiazólicos em estudo neste trabalho podem ter ação sobre o biofilme formado por *T. rubrum*. Sendo assim, foi realizado um ensaio, em triplicata, em 01 placa de 96 poços de fundo chato e com a adição de 200 μ L de uma suspensão de conídios de $2,7 \times 10^6$ con/mL em cada poço. Foram utilizados como controles apenas o fungo *T. rubrum* e o antifúngico Terbinafina em duas concentrações,

inibitória e sub-inibitória de CIM e as 06 drogas testadas também foram empregadas nessas mesmas concentrações.

A placa foi incubada a 28 °C por 04 horas para que ocorresse a adesão das células no fundo dos poços. Após esse tempo, o sobrenadante foi descartado, adicionou-se 200 µL de meio RPMI e incubou a 28 °C por 96 horas para que acontecesse a maturação do biofilme. Ao final do 4º dia, o sobrenadante foi novamente removido, foi adicionado 200 µL de meio RPMI contendo as duas concentrações dos 06 compostos e dos 02 controles e incubado a 28 °C por 24 horas. Decorrido o período de incubação, a quantificação da biomassa foi avaliada utilizando uma solução de 0,5% cristal violeta. Já a avaliação da atividade metabólica do biofilme foi realizada por meio do ensaio de redução de MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). Ambas as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (*Thermo Scientific - Multiskan Spectrum*), no comprimento de onda de 570 nm (Protocolo de modelo de infecção com *T. molitor* - produção do laboratório).

5.8 AÇÃO DOS COMPOSTOS NA MATURAÇÃO DO BIOFILME

Esses mesmos 06 compostos azólicos podem ter ação, ainda, sobre a maturação do biofilme de *T. rubrum*. Sendo assim, foi realizado um ensaio, em triplicata, em 01 placa de 96 poços de fundo chato nos mesmos moldes do anterior. A diferença é que após as 04 horas de incubação para adesão das células, foram adicionados 200 µL de meio RPMI contendo as duas concentrações (sub-inibitória e inibitória) dos 06 compostos e dos 02 controles e incubadas a 28 °C por 96 horas.

As leituras também foram realizadas em espectrofotômetro (*Thermo Scientific - Multiskan Spectrum*), no comprimento de onda de 570 nm da quantificação da biomassa utilizando uma solução de 0,5% cristal violeta e da avaliação da atividade metabólica do biofilme pelo ensaio de redução de MTT.

5.9 QUANTIFICAÇÃO DE ROS E PRN

Os compostos tiazólicos selecionados podem causar estresse oxidativo e nitrossativo no fungo, e portanto, interferir na produção de ROS e PRN. Para avaliar esses compostos, em 01 placa de 96 poços de fundo chato foram colocados 100 µL de uma suspensão de conídios de $2,7 \times 10^6$ con/mL em cada poço. Foram feitos três

controles: um apenas com a suspensão de conídios, um controle negativo apenas com o meio RPMI sem vermelho fenol e um controle positivo com o antifúngico Anfotericina B, causador desse estresse. Assim como os controles, as 06 drogas testadas foram empregadas nas concentrações sub-inibitória e inibitória.

Na placa contendo a suspensão de conídios foi adicionado 50 μ L de meio RPMI sem vermelho fenol com as duas concentrações (sub-inibitória e inibitória) de cada um dos compostos e do controle, mais 50 μ L desse mesmo meio com as sondas para ROS (10 mM 2', 7' - dichlorofluorescein diacetate) e PRN (1,2,3 dihydrorhodamine) e foi incubado a 28 °C por 03 horas e 24 horas. Foram realizadas duas leituras, com 03 e 24 horas, em fluorímetro (Synergy 2 SL Luminescence Microplate Reader; Biotek), usando a excitação em 485 nm e a emissão em 530 nm.

5.10 AVALIAÇÃO DE ESTRESSORES EM *T. rubrum* COM OS COMPOSTOS

Os testes de estresse em dermatófitos permitem avaliar as vias metabólicas ativadas em resposta ao estresse causado pelos compostos, e podem levar à identificação do mecanismo de ação. Nesse sentido, foi sugerido um ensaio que analisou a atividade da exposição de *T. rubrum* a 06 compostos tiazólicos, aos estressores osmóticos NaCl 0,5M e KCl 0,5M, de parede celular Calcofluor 50 μ g/mL e Vermelho Congo 50 μ g/mL, de retículo endoplasmático DTT 0,05% e os agentes desnaturantes de proteínas SDS 0,05%.

O teste consistiu em colocar a suspensão de conídios em contato com as 06 drogas na concentração de 90% de CIM por 03 horas. Decorrido esse tempo, essa solução foi submetida a uma nova contagem na CN, e então, cálculos e diluições foram feitos para corrigir as concentrações dos compostos para 1×10^4 con/mL, os quais foram colocados em 12 placas de Petri contendo meio ASD e cada um dos estressores e nas 02 placas controles com meio ASD apenas. Essas placas foram incubadas a 28 °C por até 05 dias e as leituras foram realizadas com 03, 04 e 05 dias.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o Software GraphPad Prism 9.0. Foram utilizadas diferentes espécies de dermatófitos nos experimentos de exposição aos compostos azólicos em estudo. Os resultados foram analisados com o teste T de

Mann-Whitney e expresso como média \pm desvio padrão nos experimentos independentes realizados em duplicata. A significância estatística foi fixada em $p < 0,05$ em todos os casos (LOZOYA-PÉREZ *et al.* 2021).

6 RESULTADOS

6.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

6.1.1 CIM dos compostos tiazólicos em meio sólido para *T. rubrum*

A CIM dos 53 compostos tiazólicos para *T. rubrum* foi determinada pelo método de diluição em meio sólido com meio ASD em placas de 48 poços. Os resultados foram sumarizados na Tabela 1 e os valores destacados em negrito representam os compostos selecionados para alguns experimentos.

Tabela 1. CIM dos 53 compostos tiazólicos para *T. rubrum*, determinada pelo método de microdiluição em meio sólido utilizando ASD.

Numeração	Identificação dos compostos	Inóculo: suspensão de conídios (µg/mL)	Inóculo: micélio (µg/mL)
01	QC Bu	>10	50
02	RJ40	10	>10
03	RJ26	>10	75
04	QNCNAc	10	>10
05	QH2	10	>10
06	FN5	5	5
07	RS17	>10	75
08	PPP2	8	8
09	RI47	>10	75
10	GNCGIh	>10	75
11	RVJ20	>10	75
12	RJ39	5	>10
13	RJ38	5	>10
14	IN2	>10	75
15	RPB2	>10	75
16	RJ12	>10	50
17	IMOF	>10	50

Numeração	Identificação dos compostos	Inóculo: suspensão de conídios (µg/mL)	Inóculo: micélio (µg/mL)
18	BFAD3d	>10	50
19	RJ46	>10	50
20	QNCGd	>10	50
21	AF31	>10	75
22	RVJ17	>10	50
23	IN17	>10	50
24	QNCGLi	>10	50
25	RI29	>10	50
26	RS10	>10	50
27	IN19	>10	50
28	IN7	10	10
29	RVJ32	3	10
30	RS11	>10	50
31	RS15	>10	50
32	RVJ27	>10	50
33	RPL19	>10	50
34	RPB9	>10	50
35	QOCMOF	>10	50
36	AFF1	3	>10
37	IBNH+	5	>10
38	AFB1	10	>10
39	QCOH	>10	50
40	EANB	>10	50
41	HI2	>10	50
42	RVJ31	8	>10
43	RVJ15	>10	50
44	RPB1	>10	50
45	RJ48	2	>10
46	ClacMII	8	>10
47	RS21	2	10

Numeração	Identificação dos compostos	Inóculo: suspensão de conídios ($\mu\text{g/mL}$)	Inóculo: micélio ($\mu\text{g/mL}$)
48	RJ42	3	10
49	RPL16	>10	50
50	IChH+	>10	50
51	RJ28	>10	50
52	RVPOH2HB4	>10	50
53	RVP05.1	>10	50

Para os 53 compostos, a linhagem de *T. rubrum* apresentou CIM entre 2 e 75 $\mu\text{g/mL}$ para os dois inóculos utilizados. Os compostos 06, 08, 12, 13, 29, 36, 37, 42, 45, 46, 47 e 48 apresentaram valores menores que 8 $\mu\text{g/mL}$ no inóculo de conídios. Enquanto que no inóculo de micélios foi observado uma CIM superior a 10 $\mu\text{g/mL}$, com exceção de 02 compostos, os n^{os} 06 e 08.

6.1.2 CIM de compostos tiazólicos em caldo para *T. rubrum*

A CIM dos 53 compostos tiazólicos para *T. rubrum* foi determinada também pelo método de microdiluição em caldo com meio RPMI em placas de 96 poços. Os resultados foram sumarizados na Tabela 2 e da mesma forma, os compostos selecionados para ensaios posteriores estão em negrito.

Tabela 2. CIM dos 53 compostos tiazólicos para *T. rubrum*, determinada pelo método de microdiluição em caldo em meio RPMI.

Numeração	Identificação dos compostos	Inóculo: suspensão de conídios (µg/mL)
01	QC Bu	60
02	RJ40	60
03	RJ26	60
04	QNCNAc	30
05	QH2	3,75
06	FN5	15
07	RS17	60
08	PPP2	7,5
09	RI47	7,5
10	GNCGIh	60
11	RVJ20	60
12	RJ39	60
13	RJ38	3,75
14	IN2	60
15	RPB2	60
16	RJ12	60
17	IMOF	60
18	BFAD3d	60
19	RJ46	60
20	QNCGd	60
21	AF31	60
22	RVJ17	>60
23	IN17	>60
24	QNCGLi	60
25	RI29	60
26	RS10	>60
27	IN19	60
28	IN7	60
29	RVJ32	3,75
30	RS11	60

31	RS15	60
32	RVJ27	60
33	RPL19	60
34	RPB9	60
35	QOCMOF	60
36	AFF1	60
37	IBNH+	60
38	AFB1	60
39	QCOH	60
40	EANB	30
41	HI2	60
42	RVJ31	7,5
43	RVJ15	60
44	RPB1	60
45	RJ48	1,875
46	ClacMII	15
47	RS21	>60
48	RJ42	15
49	RPL16	60
50	IChH+	60
51	RJ28	60
52	RVPOH2HB4	60
53	RVP05.1	60

Para os 53 compostos analisados, a linhagem de *T. rubrum* apresentou CIM entre 1,875 e >60 µg/mL para o inóculo de suspensão de conídios utilizado. Sendo que 07 compostos (n^{os} 05, 08, 09, 13, 29, 42 e 45) apresentaram CIM igual ou menor a 7,5 µg/mL.

6.1.3 CIM de compostos tiazólicos em meio sólido para *T. interdigitale*, *T. tonsurans* e *T. equinum*

Após análise dos resultados das CIMs para todos os compostos pelos dois métodos, foram selecionados os compostos listados no quadro 2, para a realização da CIM para outros dermatófitos.

Quadro 3: Compostos selecionados após análise da CIM, para teste em outros

CIM em ASD e RPMI para <i>Trichophyton rubrum</i>					
Numeração	Identificação das drogas	Concentração das drogas (mg/mL)	CIM Conídio RPMI (µg/mL)	CIM Conídio ASD (µg/mL)	CIM Micélio ASD (µg/mL)
05	QH2	1,1	3,75	10	>10
08	PPP2	1,4	7,5	8	8
13	RJ38	1,8	3,75	5	>10
29	RVJ32	1,4	3,75	3	10
42	RVJ31	1,3	7,5	8	>10
45	RJ48	1,4	1,875	2	>10

dermatófitos do gênero *Trichophyton*.

A CIM dos 06 compostos tiazólicos selecionados (n^{os} 05, 08, 13, 29, 42 e 45) em micélio de *T. interdigitale*, *T. tonsurans* e *T. equinum* foi determinada também pelo método de diluição em meio sólido ASD, em placas de 48 poços. Os resultados foram sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. CIM de 06 compostos tiazólicos para *T. interdigitale*, *T. tonsurans* e *T. equinum*, determinada pelo método de diluição em meio sólido ASD.

Numeração	Identificação dos compostos	Inóculo: micélio ($\mu\text{g/mL}$) <u><i>T. interdigitale</i></u>	Inóculo: micélio ($\mu\text{g/mL}$) <u><i>T. tonsurans</i></u>	Inóculo: micélio ($\mu\text{g/mL}$) <u><i>T. equinum</i></u>
05	QH2	25	50	25
08	PPP2	10	10	10
13	RJ38	25	25	25
29	RVJ32	25	50	25
42	RVJ31	25	25	25
45	RJ48	25	25	25

Os 06 compostos testados apresentaram CIM igual ou menor a 25 $\mu\text{g/mL}$ para as espécies *T. interdigitale* e *T. equinum*. Já para a espécie *T. tonsurans*, a CIM dos 06 compostos estudados foi igual ou menor a 50 $\mu\text{g/mL}$.

Apenas o composto nº 08 apresentou CIM igual ou menor a 10 $\mu\text{g/mL}$ para todas as espécies.

6.2 AÇÃO FUNGICIDA E FUNGISTÁTICA

De acordo com a Figura 3, os compostos nº 05, 06 e 33 possuem atividade fungicida e os demais compostos apresentam atividade fungistática, dado o perfil de crescimento do fungo na presença de cada um dos compostos. Nota-se ainda que o crescimento fúngico varia entre os compostos que apresentaram atividade fungistática no valor de CIM, isto é, em alguns casos (compostos nºs 01, 37, 38, 40 e 50) o fungo é capaz de crescer menos quando comparado com os demais.

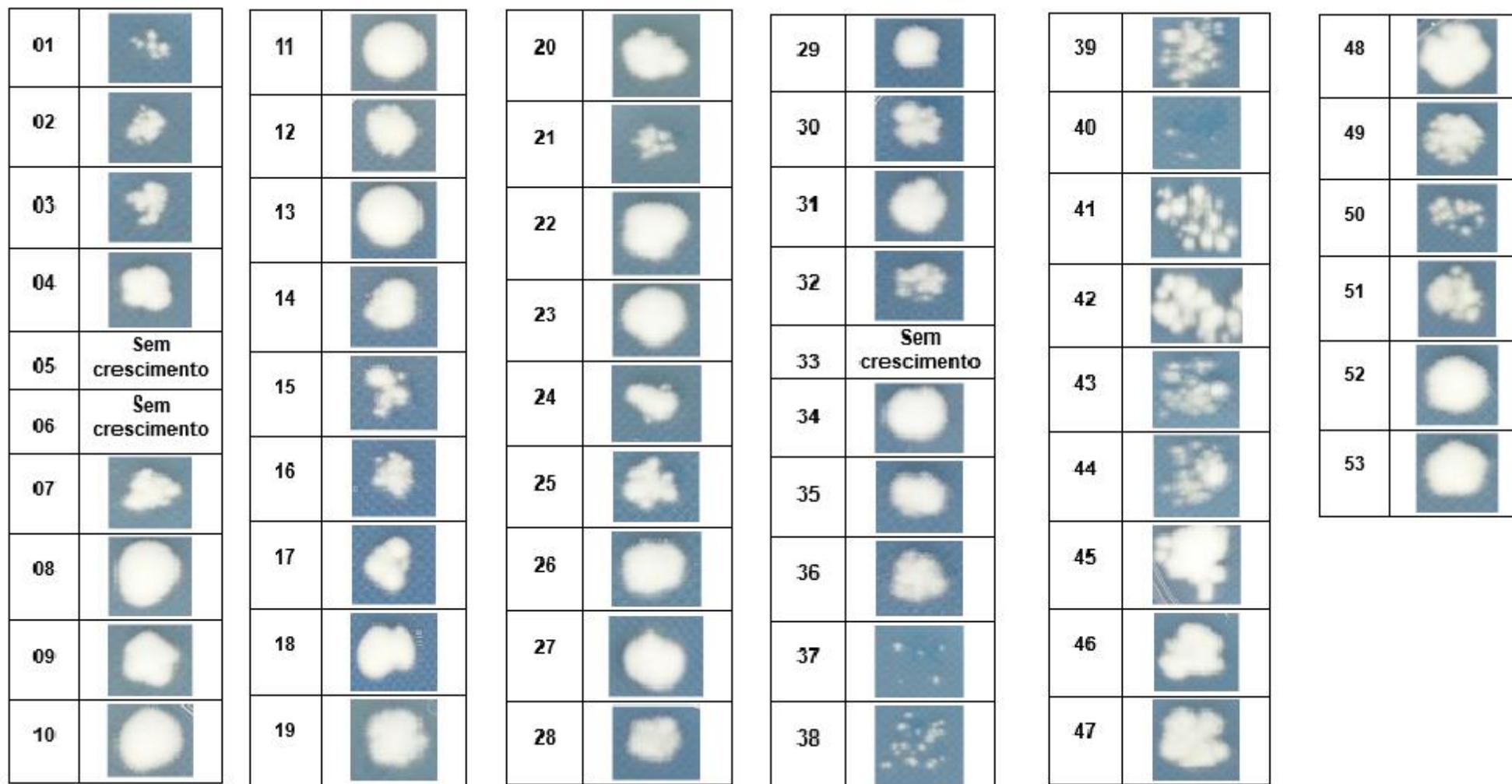


Figura 3. Crescimento de *T. rubrum* tratados com os compostos tiazólicos para avaliar a atividade fungicida e fungistática.

6.3 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO *in vitro* DE *T. rubrum*

A figura 4 ilustra a utilização de fragmentos de unhas como substrato para o crescimento fúngico na presença de duas concentrações (sub-inibitória e inibitória) dos 06 compostos diferentes, previamente selecionados. Enquanto a figura 5 demonstra o uso de exoesqueletos de *T. molitor* como substrato.

Observa-se a ausência de crescimento fúngico nas concentrações inibitórias (In) dos compostos nºs 05, 13, 29 e 42 e na concentração sub-inibitória (Sub-In) do composto nº 29. O crescimento de *T. rubrum* foi pequeno na concentração Sub-In dos compostos nºs 05, 13 e 45 e na concentração In do controle TER e nos compostos nºs 08 e 45. Entretanto, houve um grande crescimento fúngico nas concentrações Sub-In do controle TER e nos compostos nºs 08 e 42 (Figura 4).

Observa-se também a ausência de crescimento fúngico nas concentrações In do controle TER e nos compostos nºs 05, 29 e 42. O crescimento de *T. rubrum* foi pequeno na concentração Sub-In do controle TER e nos compostos nºs 05, 13, 42 e 45. Entretanto, houve um grande crescimento fúngico nas concentrações Sub-In dos compostos nºs 08, 13, 29 e 45 e na concentração In do composto nº 08 (Figura 5).

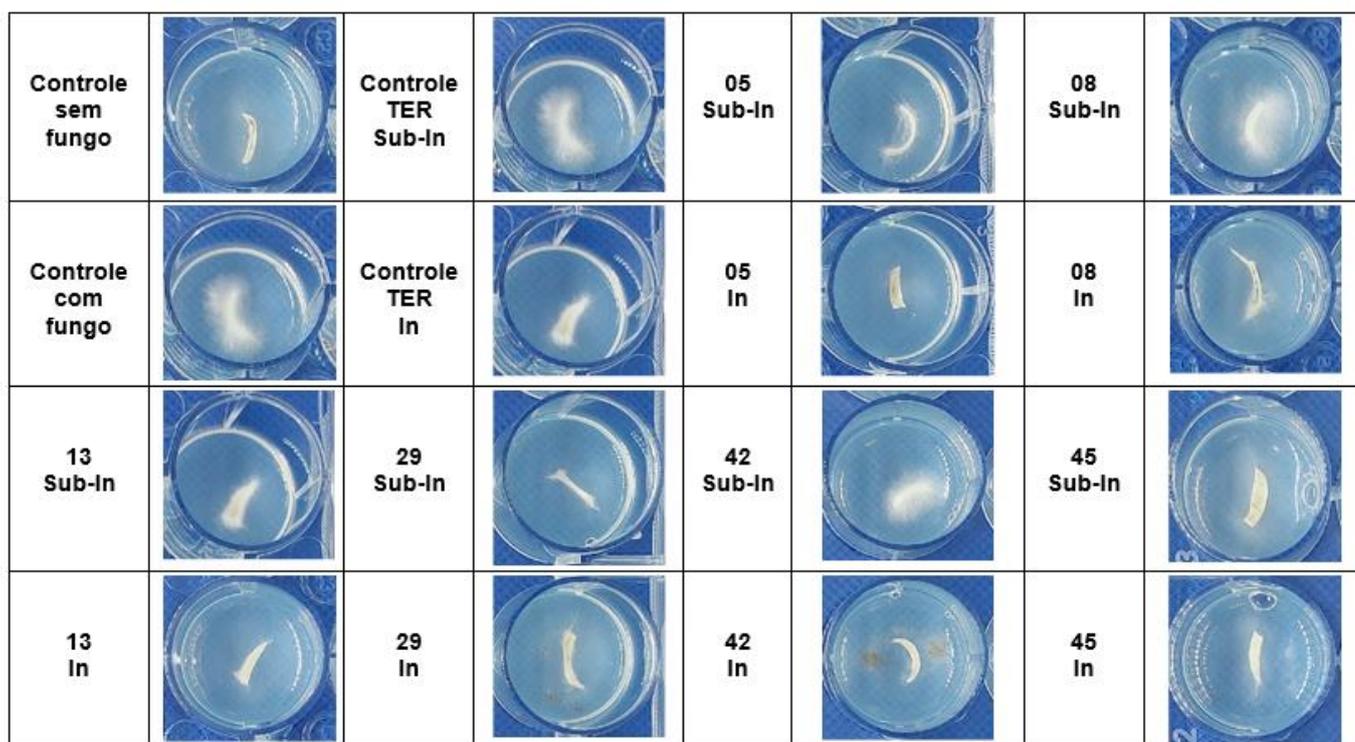


Figura 4. Atividade dos compostos tiazólicos no crescimento de *T. rubrum* em fragmentos de unhas.

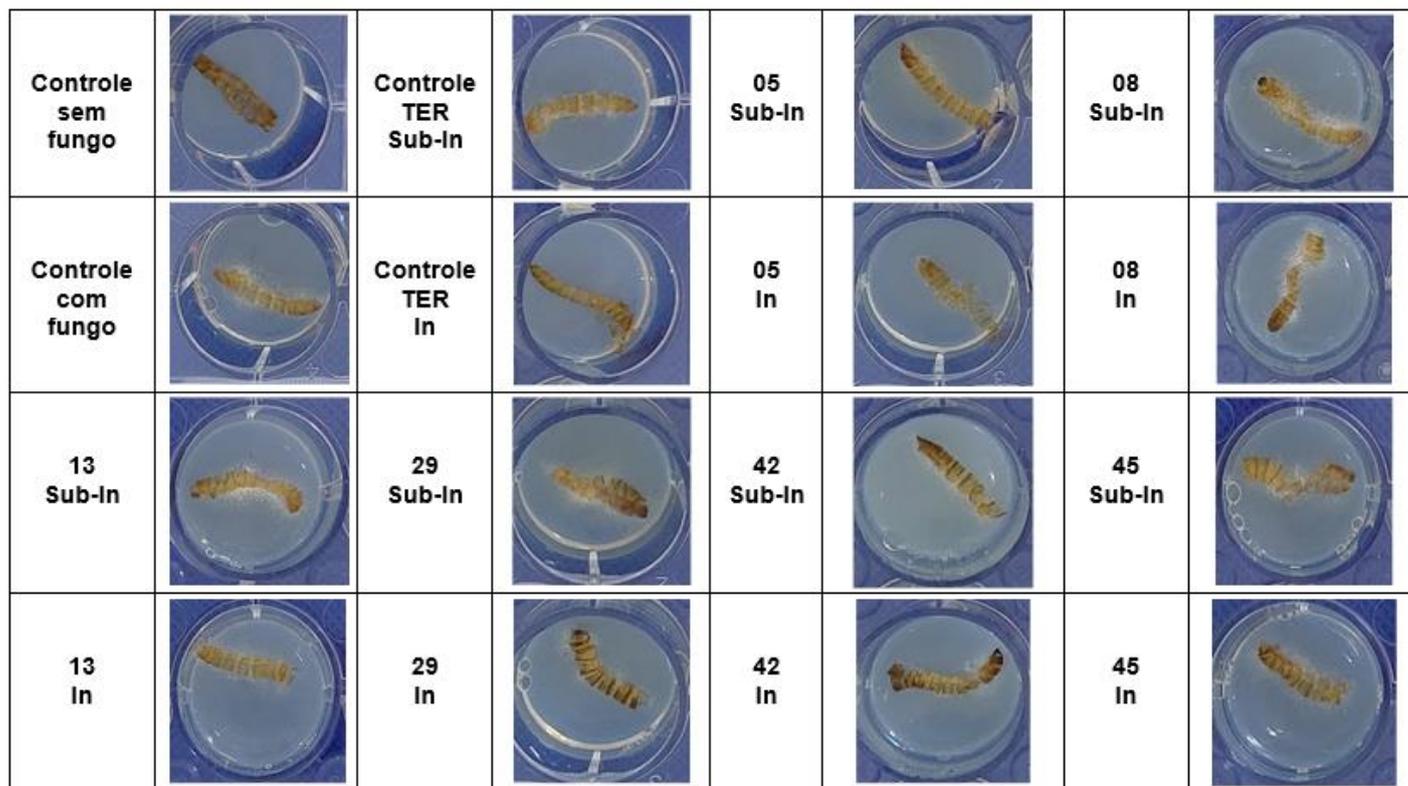


Figura 5. Avaliação da atividade dos compostos tiazólicos no crescimento de *T. rubrum* em exoesqueletos de *T. molitor*.

6.4 AÇÃO DOS COMPOSTOS NO BIOFILME

6.4.1 Quantificação da biomassa e avaliação da viabilidade do biofilme maduro

A biomassa do biofilme maduro foi quantificada utilizando uma solução de 0,5% cristal violeta em duas concentrações dos 06 compostos selecionados, uma sub-inibitória e outra inibitória.

Observa-se uma maior biomassa de biofilme na presença da concentração sub-inibitória dos compostos n^{os} 42 e 45, em relação ao controle de Terbinafina (TER). Em contrapartida, observa-se um biofilme menor na presença da concentração sub-inibitória dos compostos n^{os} 05, 08 e 29, comparado ao controle que possui apenas o fungo *T. rubrum* (C) (Figura 6A).

Na concentração inibitória é possível observar um biofilme maior em relação ao controle C no composto n^o 45. Quando comparado com o controle TER, todos os compostos analisados apresentaram um biofilme maior (Figura 6B).

Ao comparar a formação do biofilme maduro nas duas concentrações, nota-se que a concentração inibitória dos compostos leva a uma menor formação de biofilme (Figura 6.A e 6.B).

Já a viabilidade do biofilme maduro foi medida utilizando uma solução de MTT, em duas concentrações dos 06 compostos selecionados, uma sub-inibitória e outra inibitória.

Observa-se uma maior atividade metabólica do biofilme maduro na presença da concentração sub-inibitória dos compostos n^{os} 08 e 45 quando comparado com o controle C. Em contrapartida, observa-se uma maior atividade do biofilme na presença dos compostos n^{os} 08, 13 e 45 e menor atividade nos compostos n^{os} 05 e 29 em relação ao controle TER, nessa mesma concentração (Figura 6.C).

É possível observar uma menor atividade metabólica do biofilme em relação ao controle C e TER em todos os compostos analisados na concentração inibitória (Figura 6.D).

Comparando a atividade metabólica do biofilme maduro nas duas concentrações (Figura 6.C e 6.D), nota-se que a concentração inibitória dos compostos leva a uma menor atividade em todos os compostos analisados (Figura 6.D).

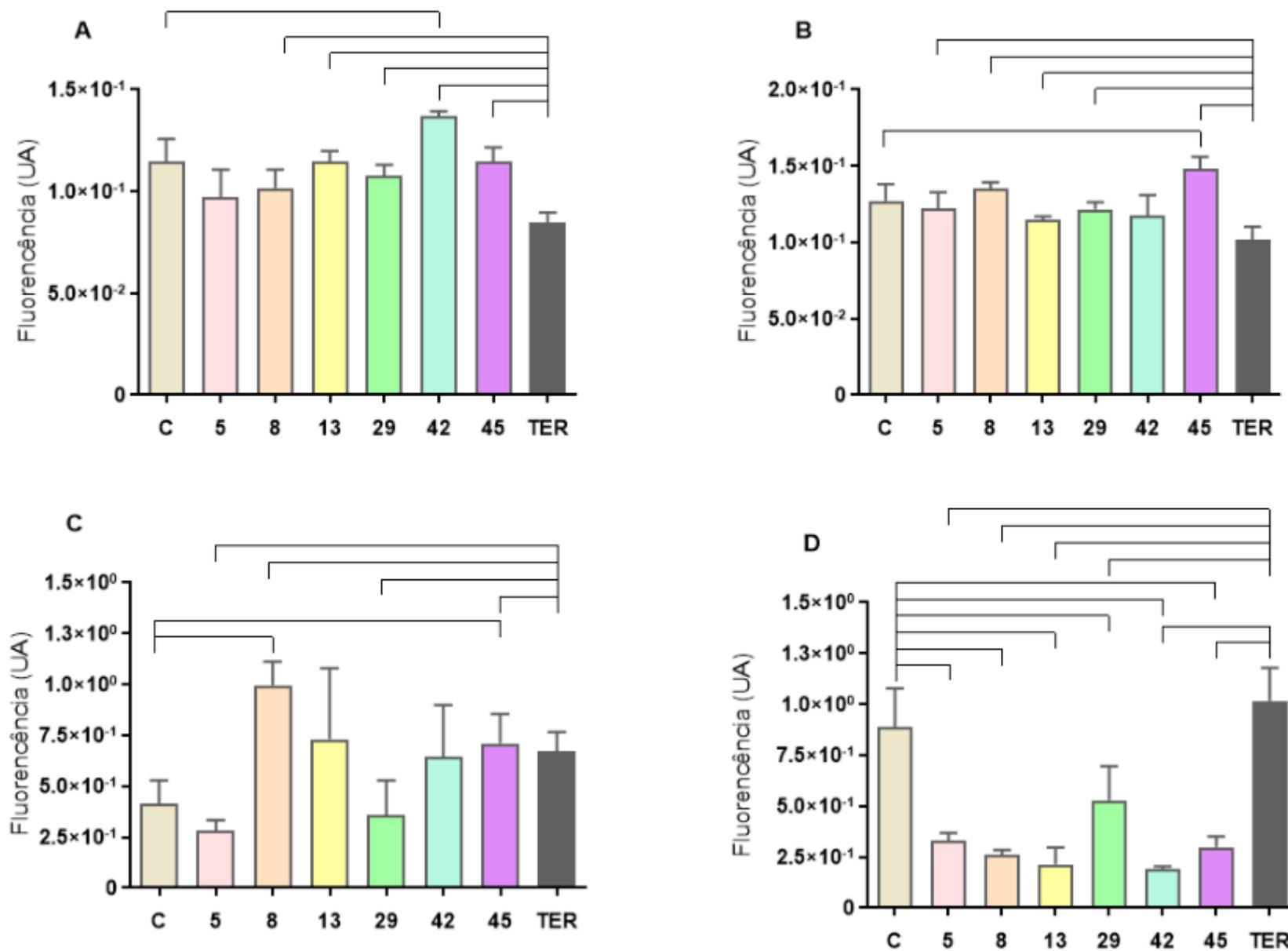


Figura 6. Ação dos compostos tiazólicos na biomassa (A e B) e na viabilidade (C e D) do biofilme maduro de *T. rubrum*, nas concentrações sub-inibitórias (A e C) e inibitórias (B e D). C: Controle apenas com fungo *T. rubrum*; TER: controle com fungo e Terbinafina.

6.4.2 Quantificação da biomassa e avaliação da viabilidade do biofilme em maturação

A biomassa do biofilme em maturação foi quantificada utilizando uma solução de 0,5% cristal violeta em duas concentrações dos 06 compostos selecionados, uma sub-inibitória e outra inibitória.

Observa-se um biofilme menor na presença da concentração sub-inibitória dos compostos n^{os} 08, 13 e 29 quando comparado com o controle C. Em contrapartida, observa-se um biofilme maior na presença dos compostos n^{os} 05, 42 e 45 em relação ao controle TER, nessa mesma concentração (Figura 7.A).

Já na concentração inibitória é possível observar um biofilme menor em relação ao controle C nos compostos n^{os} 08, 13, 29, 42 e 45. Quando comparado com o controle TER, apenas o composto n^o 29 apresentou um menor biofilme. Enquanto os compostos n^{os} 05 e 45 apresentaram um biofilme maior (Figura 7.B).

Agora comparando a formação do biofilme em maturação nas duas concentrações, nota-se que a concentração inibitória dos compostos leva a uma menor formação de biofilme (Figura 7.A e 7.B).

A viabilidade do biofilme em maturação foi medida utilizando uma solução de MTT, em duas concentrações dos 06 compostos selecionados, uma sub-inibitória e outra inibitória.

Observa-se uma menor atividade metabólica do biofilme na presença da concentração sub-inibitória dos compostos n^{os} 08, 29, 42 e 45 quando comparado com o controle C. Em contrapartida, observa-se uma maior atividade do biofilme na presença dos compostos n^{os} 05 e 13 e menor nos compostos n^{os} 08, 29 e 42 em relação ao controle TER, nessa mesma concentração (Figura 7.C).

Pode-se observar uma menor atividade metabólica do biofilme em relação ao controle C e TER na concentração inibitória dos compostos n^{os} 08, 13, 29 e 45 e n^{os} 08, 13 e 45, respectivamente (Figura 7.D).

Ao comparar a atividade metabólica do biofilme em maturação nas duas concentrações, nota-se que a concentração inibitória dos compostos leva a uma menor atividade em todos os compostos analisados (Figura 7.C e 7.D).

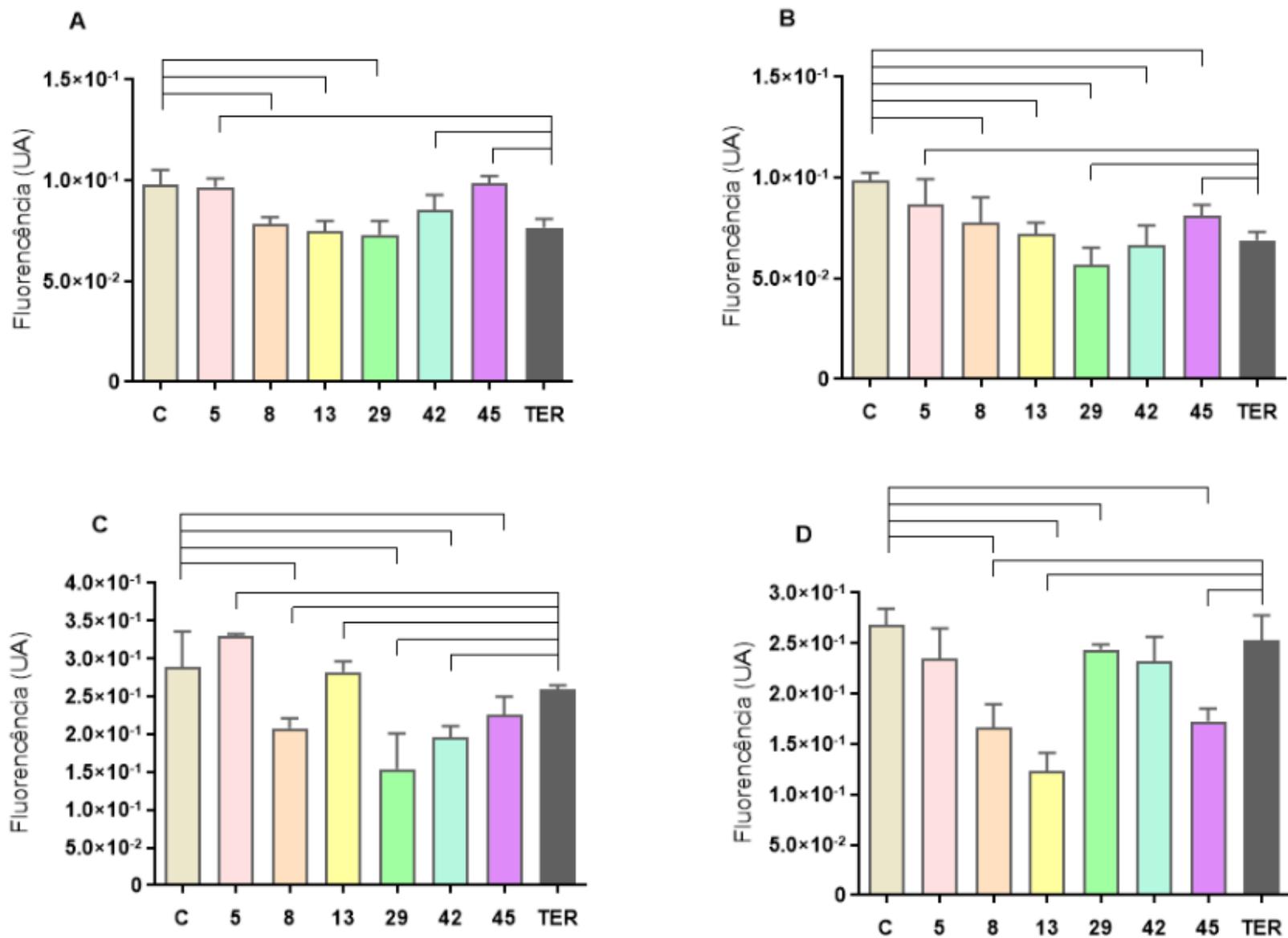


Figura 7. Ação dos compostos tiazólicos na biomassa (A e B) e na viabilidade (C e D) do biofilme em maturação de *T. rubrum*, nas concentrações sub-inibitórias (A e C) e inibitórias (B e D). C: Controle apenas com fungo *T. rubrum*; TER: controle com fungo e Terbinafina.

6.5 QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) APÓS EXPOSIÇÃO

A quantificação de ROS após 03 horas foi realizada em duas concentrações dos 06 compostos selecionados, sub-inibitória e inibitória. Após 03 horas, na concentração sub-inibitória de todos os compostos, foi observado uma produção de ROS menor daquela induzida pelo controle apenas com fungo *T. rubrum* (C) e Anfotericina B (AnfB) (Figura 8.A). Já na concentração inibitória, essa produção foi muito menor em todos os compostos quando comparada com o controle AnfB (Figura 8.B).

Ao comparar a produção de ROS nas duas concentrações, observa-se que a concentração inibitória dos compostos induz uma menor produção de ROS em todos os compostos analisados (Figura 8.A e 8.B).

A quantificação de ROS após 24 horas também foi realizada em duas concentrações dos 06 compostos selecionados, sub-inibitória e inibitória.

Após 24 horas, na concentração sub-inibitória, todos os compostos apresentaram uma produção de ROS menor daquela induzida pelo controle C e AnfB (Figura 8.C). Já na concentração inibitória, essa produção foi menor da induzida pelo controle C nos compostos n^{os} 05, 13, 29 e 42 e em todos os compostos em relação ao controle AnfB (Figura 8.D).

Ao comparar a produção de ROS nas duas concentrações, observa-se que a concentração inibitória dos compostos induz uma menor produção de ROS em todos os compostos analisados (Figura 8.C e 8.D).

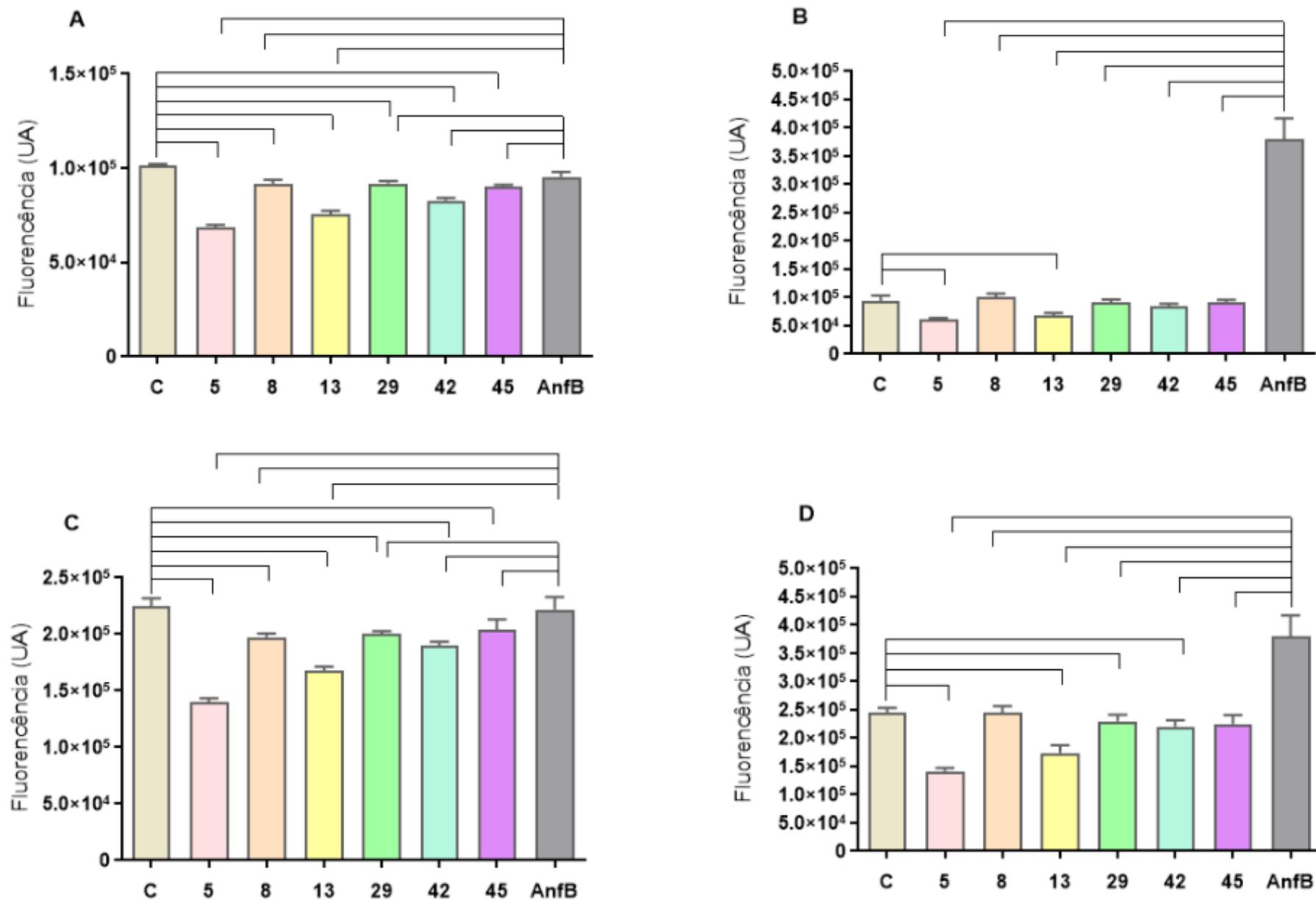


Figura 8. Atividade dos compostos tiazólicos na produção de ROS em *T. rubrum* após 03 (A e B) e 24 (C e D) horas, nas concentrações sub-inibitórias (A e C) e inibitórias (B e D). C: Controle apenas com fungo *T. rubrum*; AnfB: controle com fungo e Anfotericina B.

6.6 QUANTIFICAÇÃO DE PEROXINITRITO (PRN) APÓS EXPOSIÇÃO

A quantificação de PRN após 03 horas foi realizada em duas concentrações dos 06 compostos selecionados, sub-inibitória e inibitória. Na concentração sub-inibitória de todos os compostos, foi observado uma produção de ROS maior no composto nº 05 daquela induzida pelo controle C e AnfB (Figura 9.A) e menor nos compostos nºs 08 e 13. Já na concentração inibitória, essa produção foi menor em todos os compostos daquela induzida pelo controle C e maior nos compostos nºs 13, 29, 42 e 45 em relação ao controle AnfB (Figura 9.B).

Ao comparar a produção de PRN nas duas concentrações, observa-se que a concentração inibitória dos compostos induz uma maior produção de PRN em todos os compostos analisados, exceto no composto nº 05 na concentração sub-inibitória (Figura 9.A e 9.B).

A quantificação de PRN após 24 horas foi realizada em duas concentrações dos 06 compostos selecionados, sub-inibitória e inibitória. Na concentração sub-inibitória, apenas o composto nº 05 apresentou uma produção de PRN maior daquela induzida pelo controle C e AnfB (Figura 9.C). Já na concentração inibitória, essa produção foi maior daquela induzida pelo controle AnfB nos compostos nºs 13, 29, 42 e 45 e menor nos compostos nºs 05, 08 e 13 em relação ao controle C (Figura 9.D).

Ao comparar a produção de PRN nas duas concentrações, observa-se que a concentração sub-inibitória do composto nº 05 induz uma maior produção de PRN em relação aos demais (Figura 9.C e 9.D).

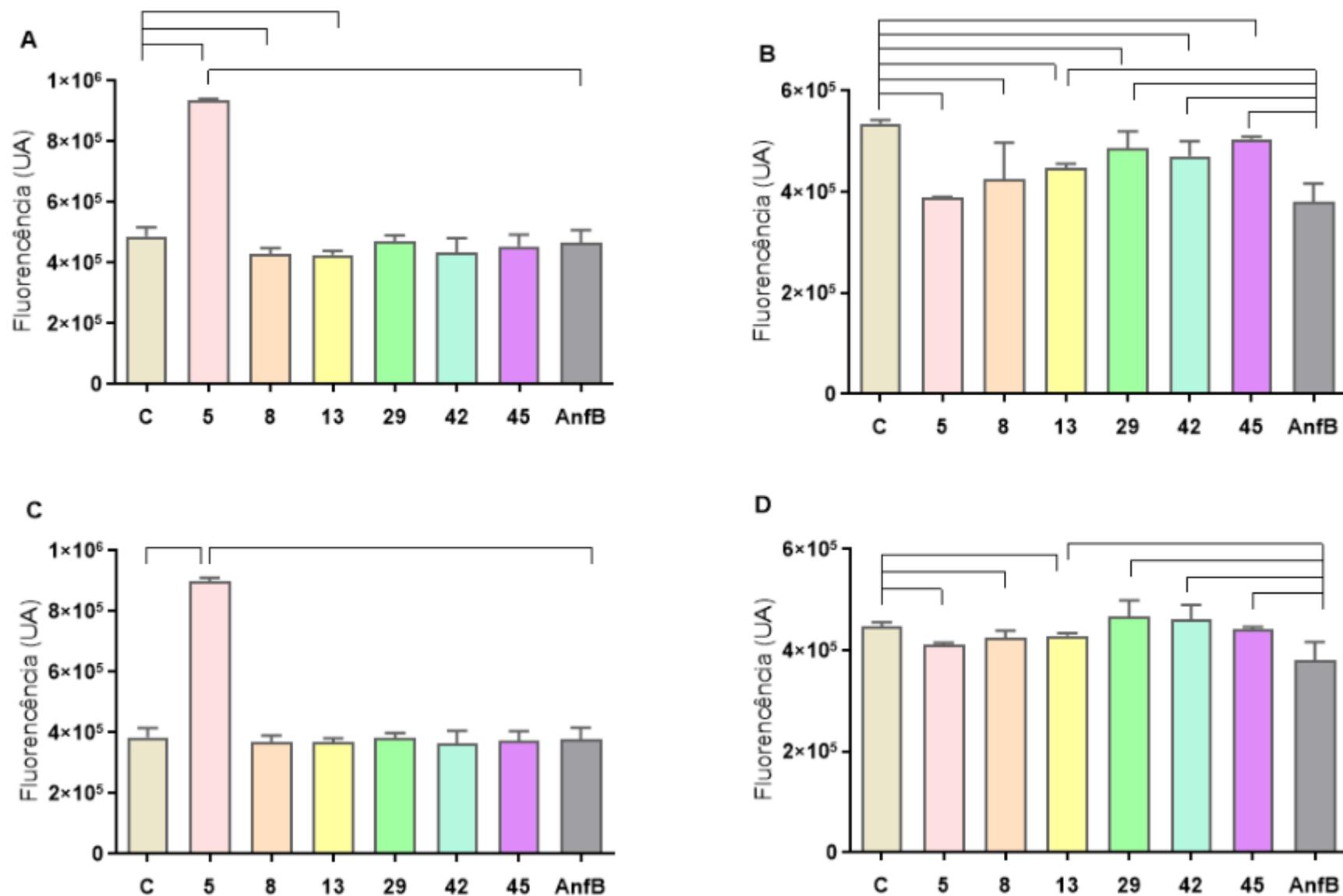


Figura 9. Atividade dos compostos tiazólicos na produção de PRN em *T. rubrum* após 03 (A e B) e 24 (C e D) horas, nas concentrações sub-inibitórias (A e C) e inibitórias (B e D). C: Controle apenas com fungo *T. rubrum*; AnfB: controle com fungo e Anfotericina B.

6.7 AVALIAÇÃO DE ESTRESSORES EM *T. rubrum*

A ocorrência do estresse provocado por estressores osmóticos NaCl 0,5M e KCl 0,5M, de parede celular Calcofluor (CFLU) 50 µg/mL e Vermelho Congo (VC) 50µg/mL, de retículo endoplasmático DTT 0,05% e os agentes desnaturantes de proteínas SDS 0,05% em *T. rubrum* tratados com os 06 compostos selecionados pode ser observado no painel abaixo (Figura 10).

É possível observar que os estressores SDS, CF e VC não foram capazes de impedir o crescimento fúngico. Já os estressores NaCl, KCl e DTT não permitiram o crescimento do fungo *T. rubrum* (Figura 10).

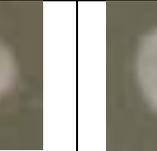
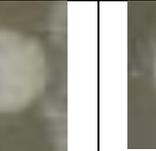
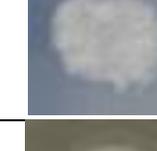
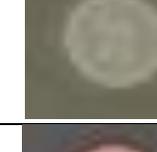
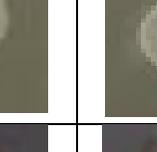
Meio + estressores	Controles 10 ⁴ µg/mL	Composto 05 10 ⁴ µg/mL	Composto 08 10 ⁴ µg/mL	Composto 13 10 ⁴ µg/mL	Composto 29 10 ⁴ µg/mL	Composto 42 10 ⁴ µg/mL	Composto 45 10 ⁴ µg/mL
Controle ASD							
ASD + NaCl		Não houve crescimento	Não houve crescimento	Não houve crescimento	Não houve crescimento	Não houve crescimento	Não houve crescimento
ASD + KCl		Não houve crescimento	Não houve crescimento	Não houve crescimento	Não houve crescimento	Não houve crescimento	Não houve crescimento
ASD + SDS							
ASD + CFLU							
ASD + VC							
ASD + DTT		Não houve crescimento	Não houve crescimento	Não houve crescimento	Não houve crescimento	Não houve crescimento	Não houve crescimento

Figura 10. Efeito da exposição de *T. rubrum* aos compostos tiazólicos na suscetibilidade a diferentes agentes estressores.

7 DISCUSSÃO

O capítulo I se inicia com os resultados das CIMs dos compostos azólicos para *T. rubrum* e proporcionam esclarecimentos sobre a atividade antifúngica para avaliar o potencial desses compostos como agentes antifúngicos, especialmente em face da crescente preocupação com a resistência antifúngica. Isso é exemplificado no trabalho de Coelho e colaboradores que traz a ocorrência de resistência aos antifúngicos tópicos e sistêmicos devido às alterações na interação da droga com o alvo ou com as enzimas da via de sinalização, por meio de mutações pontuais (COELHO *et al.* 2020).

A linhagem de *T. rubrum* testada em meio sólido (ASD) demonstra uma sensibilidade considerável aos 53 compostos avaliados, com CIM variando entre 2 e 75 µg/mL para os dois tipos de inóculos utilizados: fragmentos de micélios e suspensão de conídios. Esta ampla distribuição de valores sugere uma complexidade na resposta antifúngica das diferentes linhagens, refletindo possíveis diferenças genéticas, condições ambientais e histórico de exposição a antifúngicos.

Nesse sentido, um artigo de 2020 discute os mecanismos moleculares subjacentes à resistência antifúngica em fungos patogênicos. Os autores destacam a ocorrência de mutações genéticas que conferem resistência, bem como a expressão de genes que facilitam a expulsão de medicamentos antifúngicos das células fúngicas (LEE *et al.* 2020).

Seguindo essa linha de raciocínio, os compostos nºs 06, 08, 12, 13, 29, 36, 37, 42, 45, 46, 47 e 48 demonstram CIM inferior a 8 µg/mL quando testados com o inóculo de conídios. Esta descoberta sugere uma potencial eficácia desses compostos contra *T. rubrum* na fase conidial, que é clinicamente relevante, já que as conídios são responsáveis pela disseminação e transmissão de infecções fúngicas, de acordo com o estudo de Baldo e colaboradores. Esse trabalho identifica diferentes estratégias usadas por esses fungos para aderir à superfície da pele e penetrar nos tecidos, como a produção de enzimas que facilitam a degradação de queratina presente na pele, cabelo e unhas (BALDO *et al.* 2012).

É interessante notar que, quando o inóculo era constituído por fragmentos de micélios, a maioria dos compostos apresentou CIM superior a 10 µg/mL. No entanto, os compostos 06 e 08 demonstraram atividade antifúngica mesmo nesta condição desafiadora. Esta diferença na eficácia dos compostos entre os dois tipos de inóculos

ressalta a importância de considerar o estado metabólico das células fúngicas ao avaliar a atividade antifúngica de compostos.

Já os resultados da CIM de compostos azólicos em caldo (RPMI) para *T. rubrum* apresentaram uma grande variedade na sensibilidade aos 53 compostos avaliados, com CIM variando entre 1,875 e >60 µg/mL quando o inóculo consistia em suspensão de conídios. Esta diversidade na resposta antifúngica sugere a presença de uma heterogeneidade significativa nas linhagens de *T. rubrum*, possivelmente relacionada a diferenças genéticas, origem geográfica e exposição prévia a antifúngicos, tal qual abordado no trabalho de Cornely e colaboradores sobre aspectos diversos da mucormicose (CORNELY *et al.* 2019).

É interessante notar também que os compostos n^{os} 05, 08, 09, 13, 29, 42 e 45 demonstraram CIM igual ou inferior a 7,5 µg/mL, indicando uma alta eficácia antifúngica contra *T. rubrum* na fase conidial, como mencionado anteriormente.

A variação na sensibilidade das linhagens de *T. rubrum* aos compostos testados destaca a importância de uma abordagem personalizada no tratamento de infecções fúngicas. Além disso, a identificação de compostos com atividade antifúngica potente, especialmente contra a fase conidial de *T. rubrum*, pode ter implicações importantes no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e direcionadas.

A CIM de compostos azólicos em meio sólido para *T. interdigitale* e *T. equinum* indicam que todas as espécies testadas apresentaram uma CIM igual ou menor a 25 µg/mL para os 06 compostos avaliados. Já para *T. tonsurans*, a CIM desses compostos foi igual ou menor a 50 µg/mL. Estes achados sugerem uma potencial eficácia desses compostos contra as espécies de *Trichophyton* quando as células fúngicas estão na fase de crescimento micelial. Esta descoberta é particularmente encorajadora, pois a fase micelial é importante para o estabelecimento e a disseminação das infecções fúngicas cutâneas.

O composto n^o 08 demonstrou uma CIM igual ou menor a 10 µg/mL para todas as espécies testadas. Este resultado destaca o potencial significativo deste composto como um agente antifúngico eficaz contra um espectro diversificado de espécies de *Trichophyton*. A identificação de um composto com atividade tão promissora é de grande relevância, especialmente considerando a emergência de resistência antifúngica e a necessidade de novas opções terapêuticas. Entretanto é importante considerar a variabilidade genética dentro das espécies de *Trichophyton*, bem como

possíveis diferenças na sensibilidade aos compostos entre diferentes isolados clínicos.

A avaliação da ação fungicida e fungistática dos compostos fornece informações sobre a natureza da atividade antifúngica de diferentes compostos contra os dermatófitos. A distinção entre atividade fungicida e fungistática é fundamental para compreender o potencial desses compostos como agentes antifúngicos e para orientar estratégias terapêuticas mais eficazes, como a pesquisa de Deng e colaboradores sobre testes que avaliaram a sensibilidade antifúngica *in vitro* (DENG *et al.* 2015).

Os compostos n^{os} 05, 06 e 33 demonstraram atividade fungicida, enquanto os demais compostos apresentaram atividade fungistática. A capacidade desses 03 compostos de exibir atividade fungicida é particularmente encorajadora, pois sugere que esses compostos têm o potencial de serem eficazes no tratamento de infecções fúngicas ao eliminar completamente os patógenos. Essa propriedade é importante em infecções fúngicas graves ou resistentes, onde a erradicação completa do fungo é essencial para o sucesso terapêutico e para evitar recidivas, exemplificado no estudo da atividade antifúngica da AnfB contra espécies de *Aspergillus terreus* (VAEZI *et al.* 2018).

Por outro lado, os compostos que exibem atividade fungistática ainda têm valor terapêutico, pois podem ajudar a controlar o crescimento do fungo e prevenir a disseminação da infecção. No entanto, é importante reconhecer que esses compostos podem não ser suficientes para eliminar completamente o fungo, especialmente em casos de infecções persistentes ou recorrentes. Um exemplo disso é um trabalho de 1998 sobre a avaliação da ação fungicida da AnfB e fungistática do fluconazol e itraconazol contra espécies de *Candida* (LEWIS *et al.* 1998).

Além disso, esse ensaio revela uma variação no crescimento fúngico em resposta aos compostos que demonstraram atividade fungistática, isto é, a inibição do crescimento do fungo não ocorre de forma uniforme, sugerindo que diferentes compostos fungistáticos podem ter efeitos distintos sobre o crescimento do fungo, o que pode ser influenciado por uma série de fatores, incluindo a concentração do composto, a sensibilidade do fungo e os mecanismos de ação específicos do composto.

Essa variação no crescimento fúngico pode ter implicações no que diz respeito ao tratamento de infecções fúngicas. Por exemplo, compostos que permitem um maior

crescimento fúngico, mesmo que inibido em comparação com outros compostos, podem não ser tão eficazes no controle da infecção e na prevenção de complicações clínicas. Com isso, essa variação no crescimento fúngico destaca a complexidade da resposta do fungo aos compostos antifúngicos e ressalta a importância de considerar não apenas a atividade fungistática, mas também o perfil de crescimento do fungo em resposta ao tratamento.

Além disso, é importante compreender os mecanismos subjacentes à atividade fungicida e fungistática desses compostos, bem como sua eficácia em diferentes contextos clínicos e em relação a diferentes espécies de fungos. Dessa forma, a combinação de compostos com diferentes perfis de atividade antifúngica pode ser uma estratégia promissora para alcançar melhores resultados terapêuticos e para minimizar o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos. Esse tema é discutido no estudo de Carrillo Muñoz e colaboradores ao propor uma estratégia de terapia antifúngica combinada no tratamento de infecções invasivas, a qual pode potencializar essa atividade, reduzir a toxicidade e minimizar o desenvolvimento de resistência (CARRILLO MUÑOZ *et al.* 2014).

Partindo agora para a avaliação da infecção *in vitro* de *T. rubrum*, visando proporcionar uma análise detalhada do crescimento fúngico em diferentes substratos na presença dos seis compostos antifúngicos selecionados. A utilização de fragmentos de unhas e exoesqueletos de *T. molitor* como substratos oferece explicações sobre a eficácia dos compostos na inibição do crescimento fúngico, bem como a interação entre os compostos e os substratos utilizados.

A ausência de crescimento fúngico nas concentrações inibitórias dos compostos nºs 05, 13, 29 e 42, bem como na concentração sub-inibitória do composto nº 29, indicam uma forte atividade antifúngica desses compostos contra *T. rubrum* em fragmentos de unhas utilizados como substrato. Novamente, há uma ausência de crescimento fúngico nas concentrações inibitórias dos compostos nºs 05, 29 e 42 nos exoesqueletos de *T. molitor*. No entanto, ao observar um pequeno crescimento fúngico na concentração sub-inibitória do composto nº 29, isso é indicativo de uma possível interação entre o composto e o substrato que diminui sua eficácia.

É interessante notar que o crescimento fúngico variou dependendo do composto e da concentração utilizada, bem como do substrato empregado. Em alguns casos, como na concentração sub-inibitória do composto nº 08 e nos compostos nºs

08 e 42, houve um grande crescimento fúngico, sugerindo uma possível resistência ou menor eficácia desses compostos contra *T. rubrum* neste contexto específico.

Esses resultados destacam a importância de considerar não apenas a atividade antifúngica dos compostos, mas também a interação entre os compostos e os substratos presentes nos fungos. Além disso, ressaltam a necessidade de avaliar a eficácia dos compostos em diferentes condições e substratos para uma compreensão abrangente de sua atividade antifúngica.

Em relação a pesquisa da ação dos compostos azólicos no biofilme maduro, esta forneceu uma visão sobre a patogenicidade e resistência a tratamentos antifúngicos, tornando a compreensão dos mecanismos de formação de biofilme e a identificação de agentes que possam inibir sua formação de grande interesse clínico. Assunto esse retomado no artigo de Pereira e colaboradores que trata dos mecanismos envolvidos na formação de biofilme de *Candida albicans*, incluindo a adesão inicial das células fúngicas às superfícies, a produção de matriz extracelular e a formação de estruturas tridimensionais e sua resposta aos estímulos ambientais (PEREIRA *et al.* 2021).

Ao quantificar a biomassa do biofilme maduro na presença de concentrações sub-inibitória e inibitória dos compostos, observou-se que alguns compostos, n^{os} 05, 08 e 29, resultaram em um biofilme menor em comparação com o controle que continha apenas o fungo. Esses resultados sugerem um potencial desses compostos para inibir a formação de biofilme por *T. rubrum*, mesmo em concentrações sub-inibitórias.

No entanto, foi observado que os compostos n^{os} 42 e 45 resultaram em um biofilme maior em relação ao controle de terbinafina na mesma concentração sub-inibitória. Este resultado pode indicar uma possível resistência ou menor eficácia desses compostos na inibição da formação de biofilme por *T. rubrum*.

Quando a concentração inibitória dos compostos foi utilizada, observou-se um biofilme maior em relação ao controle C no composto n^o 45. Já em comparação com o controle TER, todos os compostos analisados resultaram em um biofilme maior na concentração inibitória. Isso pode indicar uma diferença na eficácia dos compostos em relação a esses controles na formação do biofilme.

A comparação entre as concentrações sub-inibitória e inibitória dos compostos também é relevante. Nota-se que a concentração inibitória dos compostos tende a resultar em uma menor formação de biofilme em comparação com a concentração

sub-inibitória. Isso sugere que, em concentrações mais altas, os compostos têm um maior impacto na inibição da formação de biofilme por *T. rubrum*.

A viabilidade do biofilme maduro de *T. rubrum* é essencial para avaliar a eficácia dos compostos na inibição do crescimento e na redução da atividade metabólica do biofilme, aspectos estes importantes no controle de infecções fúngicas.

Tendo isso em vista, uma menor atividade metabólica do biofilme maduro foi observada na presença da concentração sub-inibitória do composto nº 05 e 29 em comparação com o controle TER. Esse resultado sugere um potencial deste composto para reduzir a viabilidade do biofilme de *T. rubrum*, mesmo em concentrações sub-inibitórias. Por outro lado, foi observada uma maior atividade metabólica do biofilme na presença dos compostos nºs 08 e 45 em relação ao controle C e os nºs 08, 13 e 45 em relação ao controle C, na mesma concentração. Isso pode indicar uma possível resistência ou menor eficácia desses compostos na redução da viabilidade do biofilme de *T. rubrum*.

Já na concentração inibitória, foi observada uma menor atividade metabólica do biofilme em relação aos controles C e TER em todos os compostos analisados. Isso sugere que a concentração inibitória dos compostos é eficaz na redução da viabilidade do biofilme de *T. rubrum*. Além disso, ao comparar a atividade metabólica do biofilme maduro nas duas concentrações dos compostos, observa-se consistentemente uma menor atividade do biofilme na concentração inibitória. Isso confirma a eficácia das concentrações inibitórias dos compostos na redução da viabilidade do biofilme fúngico.

Assim, todos os resultados obtidos na análise do biofilme maduro são importantes porque destacam a importância dos compostos na redução da viabilidade do biofilme maduro de *T. rubrum*, um aspecto crítico no controle de infecções fúngicas.

Sobre a quantificação da biomassa do biofilme em maturação, é crucial compreender como os compostos azólicos afetam a capacidade do fungo de formar biofilme, um aspecto fundamental na patogênese das infecções fúngicas.

Sendo assim, a concentração sub-inibitória dos compostos nºs 08, 13 e 29 em comparação com o controle TER, levou a formação de um biofilme menor, sugerindo um potencial desses compostos para inibir a sua formação. No entanto, o biofilme maior na presença dos compostos nºs 05, 42 e 45 em relação a esse mesmo controle, pode indicar uma possível resistência ou menor eficácia desses compostos na inibição da formação de biofilme por *T. rubrum*.

Já na concentração inibitória, um biofilme menor em relação ao controle nos compostos nºs 08, 13, 29, 42 e 45, é indicativo de que essa concentração é eficaz na inibição da formação de biofilme fúngico. Quando se compara a formação do biofilme em maturação nas duas concentrações dos compostos, nota-se uma menor formação de biofilme na concentração inibitória. Isso sugere que a concentração inibitória dos compostos é mais eficaz na inibição da formação de biofilme de *T. rubrum* do que a concentração sub-inibitória.

Em relação à viabilidade do biofilme em maturação, a menor atividade metabólica do biofilme na presença da concentração sub-inibitória dos compostos nºs 08, 29, 42 e 45 em comparação com o controle C, sugere que esses compostos têm potencial para reduzir a viabilidade do biofilme de *T. rubrum*, mesmo em concentrações sub-inibitórias. No entanto, uma maior atividade do biofilme na presença dos compostos nºs 05 e 13 em relação ao controle na mesma concentração. Esses resultados também podem indicar uma possível resistência ou menor eficácia desses compostos na redução da viabilidade do biofilme de *T. rubrum*.

Na concentração inibitória, uma menor atividade metabólica foi observada em todos os compostos analisados, indicando que a concentração inibitória dos compostos é eficaz na redução da viabilidade do biofilme de *T. rubrum*. Ao comparar a viabilidade do biofilme em maturação nas duas concentrações dos compostos, observa-se uma menor atividade metabólica na concentração inibitória. Isso sugere que a concentração inibitória dos compostos é mais eficaz na redução da viabilidade do biofilme de *T. rubrum* do que a concentração sub-inibitória.

E mais uma vez, os resultados obtidos na análise do biofilme são importantes porque destacam o potencial desses compostos para inibir a atividade metabólica do biofilme em maturação de *T. rubrum*, um aspecto crucial na patogênese das infecções fúngicas. No entanto, são necessárias mais investigações para elucidar completamente os mecanismos subjacentes de ação dos compostos e avaliar sua eficácia *in vivo*.

A quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é fundamental para entender os mecanismos de ação dos compostos antifúngicos e seu potencial para induzir estresse oxidativo nas células fúngicas. Os resultados deste estudo revelaram uma redução significativa na produção de ROS após 03 e 24 horas de exposição às concentrações sub-inibitória e inibitória dos compostos selecionados.

Após 3 horas de exposição, na concentração sub-inibitória de todos os compostos, foi observada uma produção de ROS menor em comparação com o controle contendo apenas o fungo *T. rubrum* e AnfB. Esse resultado sugere que mesmo em concentrações sub-inibitórias, os compostos antifúngicos são capazes de reduzir a produção de ROS, indicando um possível efeito protetor contra o estresse oxidativo.

Na concentração inibitória, a produção de ROS induzida pelos 06 compostos é ainda menor em comparação com o controle AnfB, indicando que esses compostos não são capazes de estimular a produção de ROS como a AnfB, o que pode interferir na eficácia dos 06 compostos testados no comprometimento do crescimento fúngico.

Após 24 horas de exposição, os resultados foram semelhantes, com todos os compostos levando a uma produção de ROS menor em comparação com os controles, tanto na concentração sub-inibitória quanto na inibitória. Isso indica uma persistência do efeito dos compostos na redução da produção de ROS ao longo do tempo, comprometendo o seu potencial como agentes antifúngicos nesse aspecto.

Esses resultados se contrapõem com estudos anteriores que demonstraram o papel crucial do estresse oxidativo na resposta antifúngica e destacam o potencial dos compostos selecionados como candidatos promissores para o tratamento de infecções fúngicas (DELATTIN; CAMMUE; THEVISSSEN, 2014).

A avaliação da produção de peroxinitrito (PRN) após a exposição aos compostos antifúngicos é essencial para compreender os efeitos desses compostos no metabolismo e na resposta fisiológica das células fúngicas. Os resultados deste estudo revelaram diferenças significativas na produção de PRN após 03 e 24 horas de exposição às concentrações sub-inibitória e inibitória dos compostos selecionados.

Após 03 horas de exposição, na concentração sub-inibitória do composto nº 05 foi observada uma maior indução na produção de PRN em comparação com os controles. Esse achado sugere que o composto nº 05 pode induzir uma resposta mais pronunciada de PRN em comparação com os outros compostos, indicando possíveis diferenças em seus mecanismos de ação.

Por outro lado, na concentração inibitória dos compostos nºs 13, 29, 42 e 45, a produção de PRN foi maior em comparação com o controle AnfB. Isso sugere que esses compostos têm a capacidade de induzir uma produção significativa de PRN em concentrações inibitórias, o que pode estar associado à sua atividade antifúngica.

Na avaliação após 24 horas, na concentração sub-inibitória, apenas o composto nº 05 levou a uma maior produção de PRN em comparação com os controles. Isso sugere uma persistência do efeito do composto nº 05 na indução de PRN ao longo do tempo.

Já na concentração inibitória, a indução da produção de PRN foi maior nos compostos nºs 13, 29, 42 e 45 em comparação com o controle AnfB, indicando que os compostos antifúngicos podem induzir uma produção prolongada de PRN em concentrações inibitórias.

Esses resultados destacam a complexidade da resposta fisiológica das células fúngicas à exposição aos compostos antifúngicos e sugerem que a produção de PRN pode desempenhar um papel importante na resposta antifúngica. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos subjacentes à produção de PRN em resposta aos compostos antifúngicos e sua relevância para o desenvolvimento de novos tratamentos antifúngicos.

Nesse sentido, o estudo de Brown, Haynes e Quinn explora como os fungos são capazes de responder ao estresse nitrosativo e oxidativo e assim afetar sua capacidade de causar infecções em seus hospedeiros. Essa pesquisa sugere que o estresse nitrosativo, causado pela presença de óxido nítrico, pode ter efeitos tanto benéficos quanto prejudiciais para os fungos, dependendo do contexto da infecção. Além disso, os autores destacam também a importância de compreender esses mecanismos de estresse para desenvolver novas estratégias terapêuticas contra infecções fúngicas (BROWN; HAYNES; QUINN, 2009).

A avaliação da resposta de *T. rubrum* ao estresse provocado por diferentes estressores em combinação com os compostos selecionados é crucial para compreender como estes compostos afetam a capacidade do fungo de lidar com condições ambientais adversas. Os resultados deste estudo revelaram diferenças marcantes na capacidade dos estressores em afetar o crescimento fúngico, especialmente quando combinados com os compostos selecionados.

Observou-se que os estressores SDS, Calcofluor (CFLU) e Vermelho Congo (VC) não foram capazes de impedir o crescimento fúngico, indicando uma resistência do fungo a esses estressores específicos. Esses resultados sugerem que, mesmo na presença desses agentes estressores conhecidos por afetar a integridade da parede celular e desnaturar proteínas, o fungo pode manter seu crescimento e viabilidade.

Por outro lado, os estressores NaCl, KCl e DTT demonstraram ser eficazes em inibir o crescimento do fungo *T. rubrum*. Esses estressores osmóticos e agentes desnaturantes de proteínas parecem ter um impacto significativo na capacidade de crescimento do fungo, sugerindo uma vulnerabilidade de *T. rubrum* a condições de estresse osmótico e alterações na estrutura das proteínas.

A observação de que os compostos selecionados não alteraram significativamente a resposta do fungo ao estresse provocado pelos diferentes estressores é interessante. Isso sugere que esses compostos podem não ter um efeito direto na resposta fúngica ao estresse celular induzido pelos estressores testados. No entanto, é importante considerar que os compostos podem ter outros efeitos antifúngicos que não foram avaliados neste estudo.

Esses resultados destacam a complexidade da resposta de *T. rubrum* ao estresse celular e ressaltam a importância de investigar os mecanismos subjacentes à resistência e sensibilidade do fungo a diferentes estressores ambientais. Além disso, sugerem que estratégias terapêuticas que visam direcionar especificamente os mecanismos de estresse fúngico podem representar uma abordagem promissora para o tratamento de infecções fúngicas.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo fornecem informações valiosas sobre a atividade antifúngica de compostos tiazólicos contra *T. rubrum* e outras espécies relacionadas, bem como sobre a resposta do fungo ao estresse provocado por diferentes estressores. Essas descobertas são de grande importância, especialmente em um cenário onde a resistência antifúngica está se tornando uma preocupação crescente.

A análise das CIMs dos compostos tiazólicos revelou uma ampla gama de sensibilidades entre as linhagens de *T. rubrum*, indicando possíveis diferenças genéticas e ambientais. Compostos específicos demonstraram eficácia notável contra *T. rubrum* na fase conidial, uma descoberta clinicamente relevante dada a importância desses estágios na disseminação das infecções fúngicas.

A distinção entre atividade fungicida e fungistática dos compostos é crucial para entender seu potencial terapêutico. Compostos com atividade fungicida podem oferecer vantagens no tratamento de infecções graves, enquanto compostos fungistáticos ainda são valiosos para controlar o crescimento fúngico e prevenir a disseminação da infecção.

A avaliação da formação de biofilme revelou a capacidade de alguns compostos em inibir sua formação e reduzir sua viabilidade. Isso é especialmente relevante, pois os biofilmes fúngicos representam um desafio terapêutico significativo devido à sua resistência aos antifúngicos convencionais.

Além disso, a análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e produtos de reação a nitrogênio (PRN) fornece dados sobre os mecanismos de ação dos compostos antifúngicos. A redução na produção de ROS e a indução de PRN sugerem mecanismos de ação específicos dos compostos, o que pode contribuir para sua eficácia antifúngica.

No entanto, é importante ressaltar que mais pesquisas são necessárias para entender completamente os mecanismos de ação dos compostos e avaliar sua eficácia *in vivo*. Além disso, a investigação da interação entre os compostos e os substratos fúngicos, bem como a avaliação da atividade antifúngica em diferentes condições clínicas, são áreas que merecem atenção adicional.

Os testes de compostos tiazólicos para dermatófitos representam uma área de pesquisa em constante evolução, com o potencial de fornecer terapias mais eficazes

e seguras para infecções fúngicas cutâneas. Ao explorar os avanços recentes e as futuras direções nesta área, os pesquisadores podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras e melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados por dermatofitose.

Embora os testes de compostos tiazólicos para dermatófitos ofereçam promessas no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, é importante reconhecer e abordar as limitações e possíveis problemas associados a esses estudos. A compreensão dessas questões pode orientar o planejamento experimental, a interpretação dos resultados e o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes e seguras para o tratamento de infecções fúngicas cutâneas.

Em suma, os resultados deste estudo contribuem significativamente para o conhecimento sobre a atividade antifúngica de compostos azólicos contra *T. rubrum* e destacam a complexidade da resposta do fungo ao estresse celular. Essas descobertas podem informar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e ajudar a mitigar os desafios associados ao tratamento de infecções fúngicas.

9 PERSPECTIVAS

O tratamento das dermatofitoses é frequentemente realizado com compostos azólicos, uma classe de agentes antifúngicos amplamente utilizada. Nesse sentido, esta pesquisa abriu caminhos para explorar novos avanços nos testes realizados em compostos tiazólicos para dermatófitos, com intuito de destacar suas importâncias no desenvolvimento de novas terapias antifúngicas.

Avanços significativos em compostos com atividade antifúngica contra dermatófitos se fazem necessários, a fim de demonstrar a eficácia melhorada e menor toxicidade em comparação com agentes antifúngicos tradicionais.

Aprofundar o estudo dos mecanismos de ação dos novos compostos e dos mecanismos de resistência dos dermatófitos é fundamental para o desenvolvimento de terapias eficazes. E dessa forma, novas pesquisas devem ser propostas para investigar os alvos moleculares específicos nos fungos, bem como os mecanismos genéticos subjacentes à resistência aos antifúngicos, com o objetivo de identificar estratégias terapêuticas mais direcionadas e duradouras.

Realizar a avaliação da susceptibilidade dos dermatófitos aos compostos tiazólicos por meio de ensaios *in vitro*, com a finalidade de fornecer informações sobre a concentração inibitória mínima e a concentração fungicida mínima dos antifúngicos. Além disso, executar testes pré-clínicos em modelos animais e em culturas de tecido humano serão essenciais para avaliar a eficácia e a segurança dos compostos antes de sua aplicação clínica.

Estudar o uso de combinações de compostos tiazólicos com outros agentes antifúngicos ou adjuvantes terapêuticos para serem exploradas como uma estratégia para superar a resistência fúngica e melhorar a eficácia do tratamento. Mais estudos devem ser desenvolvidos para demonstrar o sinergismo entre os compostos azólicos e outras classes de antifúngicos, bem como compostos naturais e terapias alternativas.

Apesar dos avanços, ainda existem desafios significativos a serem superados no desenvolvimento e aplicação desses compostos em dermatófitos. Estes incluem a emergência de resistência antifúngica, a toxicidade dos agentes antifúngicos, a falta de padronização nos métodos de teste e a necessidade de estudos clínicos bem controlados para avaliar a eficácia e a segurança dos tratamentos.

CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ALTERNATIVO DE INFECÇÃO EM LARVAS DE *T. MOLITOR* POR DERMATÓFITOS

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar uma metodologia de modelo de infecção em larvas de *T. molitor* para estudar a virulência de dermatófitos, iniciando por *T. rubrum*.
- Extrapolar esse modelo para os dermatófitos *T. interdigitale*, *T. tonsurans*, *T. equinum*, *M. canis* e *M. gypseum*.
- Analisar as curvas de sobrevivência das larvas de *T. molitor*, pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) no exoesqueleto e na hemolinfa, bem como determinar a carga fúngica nas larvas de *T. molitor*.
- Avaliar a fagocitose fúngica por hemócitos de *T. molitor* e analisar os níveis de hemócitos, de lactato desidrogenase e a atividade da fenoloxidase.
- Avaliar esse modelo de infecção quanto à atividade de compostos antifúngicos, utilizando Terbinafina, Itraconazol e Fluconazol, comumente utilizados na prática clínica.

5 METODOLOGIA

5.12 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas espécies de dermatófitos pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG. Além disso, todas as espécies utilizadas nesse estudo possuem genoma sequenciado, de acordo com trabalho de Martinez e colaboradores (MARTINEZ *et al.* 2012).

Inicialmente, foi proposto um modelo alternativo de infecção de *T. molitor* por *Trichophyton rubrum* (CBS118892), por este ser um dermatófito antropofílico e o mais comumente isolado de micoses em humanos. Posteriormente será avaliado para os outros dermatófitos: *Trichophyton interdigitale* (H6, ATCC MYA3801), *Trichophyton tonsurans* (CBS112818), *Trichophyton equinum* (CBS127.97), *Microsporum canis* (CBS113480) e *Microsporum gypseum* (CBS118893).

5.13 MEIOS DE CULTURA

Os meios ASD, ABD e AEM foram vertidos em placas de Petri 90x15 para repique das culturas fúngicas, as quais foram utilizadas no preparo dos inóculos para cada experimento de modelo de infecção.

5.14 QUESTÕES ÉTICAS

De acordo com os Artigos 1º e 2º da Lei Federal nº 11.794 de 2008 que regulamenta sobre procedimentos para o uso científico de animais, a criação e utilização de animais em atividades de pesquisa aplica-se aos animais das espécies classificadas como filo *Chordata* e subfilo *Vertebrata* (Site do Planalto).

Sendo assim, o uso experimental de invertebrados, como é o caso das larvas de inseto da espécie *T. molitor* utilizadas nesse estudo, não requer envio de proposta de pesquisa para aprovação e liberação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

5.15 PREPARO DO INÓCULO

O preparo do inóculo com suspensão de conídios utilizado nos experimentos listados a seguir se baseou em alguns estudos que utilizaram uma suspensão de conídios ou uma mistura de conídios e fragmentos de hifas (CAMBIER *et al.* 2017). Isso porque os artroconídios são comumente empregados para infectar experimentalmente outros animais, de acordo com outros estudos (FAWAY *et al.* 2021).

As espécies de dermatófitos previamente cultivadas em placas de AEM a 28 °C por 21 dias. Após esse período, uma alíquota de até 5 mL de salina estéril foi adicionada às placas contendo os fungos; com auxílio de uma alça, os fungos foram desprendidos do meio sólido e misturados à solução salina. Posteriormente, a solução contendo as células fúngicas foi transferida para um falcon de 50 mL e agitada em vórtex por aproximadamente 5 minutos. A seguir, a suspensão foi filtrada em funil estéril contendo lã de vidro; a suspensão resultante foi centrifugada por 10 min à 25 °C a 4000 RPM. O pellet resultante foi recuperado e ressuspendido em solução salina 0,9% para dar origem à suspensão de conídios.

Para estimar a concentração dos conídios e preparar o inóculo correto para cada experimento, uma alíquota de 10 µL da suspensão contendo conídios foi contada na Câmara de Neubauer (CN). A leitura foi realizada contando os 5 quadrantes na diagonal, multiplicado por 5×10^4 para corrigir o valor total na câmara. Caso a solução estivesse muito concentrada e impossibilitasse a contagem dos conídios, uma diluição com salina deveria ser feita (podendo ser de 10x ou 100x) e ao final, o fator de diluição deveria ser multiplicado também. Sendo assim, ao término da contagem, o resultado seria dado em conídios/mL.

A partir do inóculo preparado, cada experimento usou uma concentração determinada de conídios, variando entre $1,0 \times 10^7$ até $1,0 \times 10^3$ células/mL. Foi estabelecido que para os testes em larva de *T. molitor*, poderia ser injetada com uma suspensão de $1,0 \times 10^6$ até $1,0 \times 10^3$ células/5µL/larva. E para os demais experimentos, os cálculos necessários foram realizados para as devidas correções e adequações (Protocolo de modelo de infecção com *T. molitor* - produção do laboratório).

5.16 ENSAIOS DE SOBREVIVÊNCIA DE *T. molitor*

As larvas de *T. molitor* foram adquiridas de criadores em lojas especializadas. Foram alimentadas *ad libitum* com ração e para manter a hidratação, foram adicionados pedaços de maçã, cenoura ou chuchu em pequenas quantidades.

As larvas foram selecionadas e hidratadas no dia anterior ao experimento e, obrigatoriamente, não apresentaram lesões e manchas corporais visíveis ou sinais de melanização. Os insetos foram pesados no dia do ensaio, o peso de cada larva estava entre 100 e 200 miligramas e os grupos experimentais foram divididos em dois grupos controles e quatro grupos testes.

O ensaio foi realizado em duplicata e cada grupo experimental era composto por 12 larvas. Havia dois grupos controle: um contendo larvas sem inóculo e outro contendo larvas inoculadas somente com PBS, sem a presença dos conídios. Para a infecção, foi realizada a assepsia de cada uma das larvas com álcool 70% e os grupos testes foram infectados, por meio de pulverização e por inoculação com seringa Hamilton de 5 µL da suspensão de conídios em diferentes concentrações, preparada anteriormente. Diferentes concentrações de conídios foram avaliadas para determinar a melhor carga fúngica em função da taxa de sobrevivência das larvas à temperatura ambiente, sendo elas: 5×10^5 , 5×10^3 e $1,075 \times 10^4$.

Após exposição e inoculação, as larvas foram mantidas em placas de Petri com ração, em estufa de 28°C, para acompanhamento e observação de lesões ou até que todas as larvas sucumbissem à infecção. Larvas mortas foram definidas como as que não apresentaram sinais de irritabilidade e tiveram encolhimento e extensa melanização corporal. Com a intenção de evitar a taxa de mortalidade por manipulação e lesões mecânicas, as larvas foram manuseadas com cuidado. As larvas foram observadas por até 45 dias.

5.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o Software GraphPad Prism 9.0. Um total de 12 larvas por grupo foram usadas nos experimentos de exposição aos dermatófitos. Os resultados foram analisados com o teste U de Mann-Whitney e expresso como média \pm desvio padrão de experimentos independentes realizados em duplicata. A significância estatística foi fixada em $p < 0,05$ em todos os casos.

6 RESULTADOS

6.8 ENSAIOS DE SOBREVIVÊNCIA DE *T. molitor*

No primeiro experimento, foi utilizado um inóculo de suspensão de conídios na concentração de 5×10^5 con/mL. As larvas de *T. molitor* foram acompanhadas por 25 dias. A finalidade foi padronizar um método para o desenvolvimento de um modelo de infecção de *T. rubrum*. A Figura 11 mostra a taxa de sobrevivência das larvas de *T. molitor* infectados com *T. rubrum* ao longo dos dias.

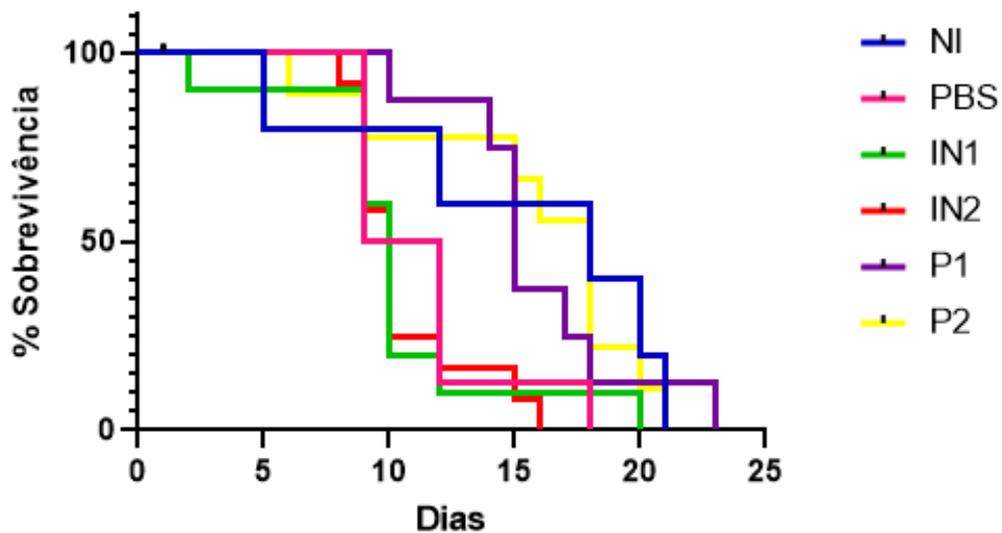


Figura 11. Curva de sobrevivência das larvas de *T. molitor* infectadas com 5×10^5 con/mL de *T. rubrum* ao longo de 25 dias.

NI: grupo de larvas não inoculadas.

PBS: grupo de larvas inoculadas apenas com PBS.

IN1: duplicata 1 de larvas inoculadas com fungo.

IN2: duplicata 2 de larvas inoculadas com fungo.

P1: duplicata 1 de larvas pulverizadas superficialmente com fungo.

P2: duplicata 2 de larvas pulverizadas superficialmente com fungo.

No segundo experimento, foi utilizado um inóculo de suspensão de conídios na concentração de 5×10^3 con/mL. As larvas de *T. molitor* foram acompanhadas por 45 dias. A finalidade foi observar a capacidade de sobrevivência das larvas de *T. molitor*. A figura 12 mostra a taxa de sobrevivência das larvas de *T. molitor* infectados com *T.*

rubrum ao longo dos dias.

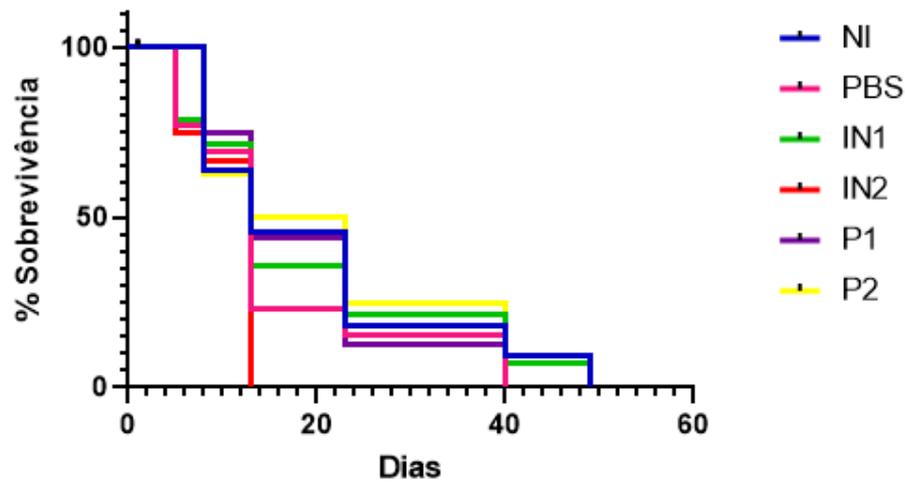


Figura 12. Curva de sobrevivência das larvas de *T. molitor* infectadas com 5×10^3 con/mL de *T. rubrum* ao longo de 45 dias.

NI: grupo de larvas não inoculadas.

PBS: grupo de larvas inoculadas apenas com PBS.

IN1: duplicata 1 de larvas inoculadas com fungo.

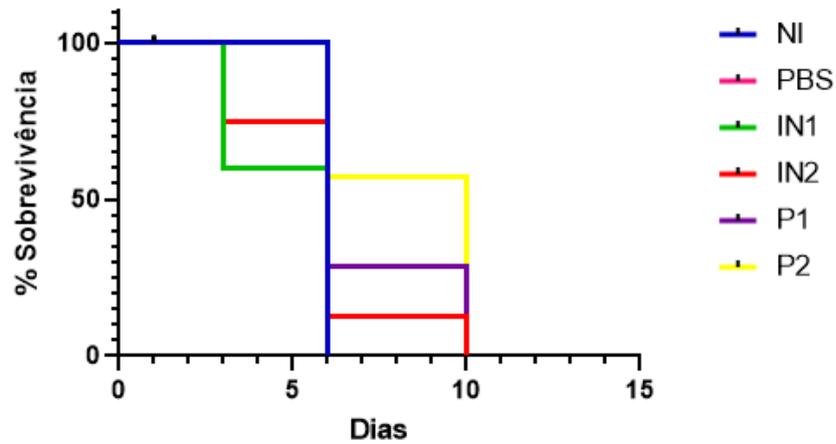
IN2: duplicata 2 de larvas inoculadas com fungo.

P1: duplicata 1 de larvas pulverizadas superficialmente com fungo.

P2: duplicata 2 de larvas pulverizadas superficialmente com fungo.

No terceiro experimento, foi utilizado um inóculo de suspensão de conídios na concentração de $1,075 \times 10^4$ con/mL. As larvas de *T. molitor* foram acompanhadas por apenas 10 dias. A finalidade foi observar a mortalidade dos grupos controles não infectados e inóculos com PBS. A figura 13 mostra a taxa de sobrevivência das larvas de *T. molitor* infectados com *T. rubrum* ao longo dos dias.

Figura 13. Curva de sobrevivência das larvas de *T. molitor* infectadas com $1,075 \times$



10^4 con/mL de *T. rubrum* ao longo de 10 dias.

NI: grupo de larvas não inoculadas.

PBS: grupo de larvas inoculadas apenas com PBS.

IN1: duplicata 1 de larvas inoculadas com fungo.

IN2: duplicata 2 de larvas inoculadas com fungo.

P1: duplicata 1 de larvas pulverizadas superficialmente com fungo.

P2: duplicata 2 de larvas pulverizadas superficialmente com fungo.

7 DISCUSSÃO

Os dermatófitos são fungos patogênicos que causam infecções cutâneas superficiais em humanos e outros animais (MARTINEZ-ROSSI *et al.* 2021). A busca por modelos alternativos para estudar a patogenicidade e a resposta imune a esses microrganismos é fundamental para avançar no desenvolvimento de terapias e medidas de prevenção mais eficazes (PERES *et al.* 2010).

No capítulo II deste trabalho, os ensaios de sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* foram usados para avaliar o uso desse modelo como uma opção para o estudo da patogenicidade e de estratégias de tratamento para dermatófitos. Esse modelo é uma opção promissora oferecendo vantagens como disponibilidade, facilidade de manuseio, resposta imune semelhante à de mamíferos, baixo custo e capacidade de avaliar a virulência dos dermatófitos em um contexto biológico relevante (MAGALHÃES *et al.* 2021).

Tendo em vista que não existe um modelo de infecção ideal já definido e estabelecido para estudo das dermatofitoses, foi necessário propor o desenvolvimento de um modelo que possibilitasse o entendimento das dermatofitoses em modelos biológicos. Com o objetivo de avaliar a viabilidade e a eficácia dos ensaios de sobrevivência de *Tenebrio molitor* como um modelo alternativo de infecção para dermatófitos, foram realizados três experimentos com diferentes lotes de larvas em três épocas distintas com o dermatófito *T. rubrum*.

Para tal, no primeiro ensaio, o acompanhamento durante 25 dias indicou que a morte dos grupos controles (não infectados e infectados apenas com PBS) nos primeiros 10 dias pode estar relacionada com a viabilidade das larvas, ou seja, as larvas apresentaram uma idade avançada e já estariam próximas do fim nesta fase do ciclo. Já a morte dos 04 grupos testes (inoculados e pulverizados com a suspensão de conídios) nos próximos 15 dias evidenciou que os fungos podem ter causado infecção nas larvas e levado ao óbito.

No segundo, o fornecedor das larvas de *T. molitor* foi trocado no intuito de solucionar o problema de larvas velhas, uma vez que essas larvas podem ser um bom modelo para dermatófitos já que outros estudos do Laboratório de Micologia obtiveram êxito ao usá-los como modelo para outros fungos. Assim, o acompanhamento ao longo de 45 dias mostrou uma morte mais lenta dos grupos controles e testes,

indicando que a utilização de um inóculo com uma menor concentração de conídios (5×10^3 con/mL) pode ter sido o motivo de um menor potencial lesivo nas larvas.

E por último, o terceiro experimento evidenciou uma morte mais rápida das larvas nos grupos controles (6 dias) e testes (10 dias), sinalizando que as larvas são suscetíveis a infecção por *T. rubrum*. Nesse caso, será necessário aperfeiçoar as técnicas de infecção e estabelecer um protocolo para aprimorar a utilização das larvas de *T. molitor* como modelo de infecção.

8 CONCLUSÃO

Comparado aos modelos animais tradicionais, como camundongos, o uso de larvas de *Tenebrio molitor* é vantajoso por questões éticas, logísticas e econômicas, além de permitir a execução de testes de alta eficiência em larga escala e com baixo custo. Nesse sentido, o protocolo de utilização das larvas de *Tenebrio molitor* como modelo de infecção proposto requer ajustes e acertos com a finalidade de obtenção de resultados mais robustos e reprodutíveis.

Entretanto, os resultados alcançados com os ensaios realizados poderão servir para estudos e pesquisas correlatas posteriores. Para tal, os experimentos devem ser efetuados com algumas correções, tais como a troca do produtor das larvas ou propor e desenvolver o cultivo delas no nosso laboratório.

Espera-se que os novos ensaios de sobrevivência de larvas de *T. molitor* forneçam informações valiosas sobre a patogenicidade dos dermatófitos e sua resposta a diferentes intervenções terapêuticas. Além disso, espera-se que este estudo demonstre a validade e a utilidade deste modelo alternativo na pesquisa biomédica. Esses ensaios de sobrevivência representam uma abordagem favorável para investigar a patogenicidade de dermatófitos e avaliar a eficácia de tratamentos antifúngicos. Este estudo contribuirá para o avanço do conhecimento científico nesta área e pode fornecer dados importantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra infecções fúngicas cutâneas.

9 PERSPECTIVAS

Este trabalho buscou discutir os avanços recentes no campo dos modelos alternativos de infecção para dermatófitos e suas potenciais aplicações. Nesse contexto, algumas visões são sugeridas abaixo:

1. Considerando que os testes iniciais utilizando as larvas de *Tenebrio molitor* não retornaram com resultados totalmente satisfatórios, eles servem de base para o desenvolvimento e aprimoramento de novos protocolos de infecção *in vivo*.

2. Validar os ensaios de sobrevivência de larvas de *T. molitor* como um modelo alternativo confiável para estudar a patogenicidade de dermatófitos e para investigar a interação entre o fungo e o hospedeiro.

3. Ampliar a aplicabilidade desses ensaios de sobrevivência, com o objetivo de oferecer uma plataforma versátil na pesquisa de dermatófitos. Dessa forma, ao avaliar a virulência de diferentes cepas de fungos, esses ensaios podem ser usados para testar a eficácia de agentes antifúngicos, investigar mecanismos de patogenicidade e explorar estratégias terapêuticas alternativas.

10 INOVAÇÃO E CONTRIBUIÇÃO DO TRABALHO

O presente trabalho traz como inovação a possibilidade de realizar testes de eficiência dos 53 compostos azólicos com potencial atividade contra dermatófitos no modelo de infecção com larvas de *T. molitor* mimetizando as condições de infecção e tratamento.

11 LIMITAÇÕES DO ESTUDO E POSSÍVEIS PROBLEMAS

- ❖ O desenvolvimento de modelos alternativos de infecção por dermatófitos é um desafio, no que tange à diversidade e especificidade de hospedeiros desses microrganismos.
- ❖ A dermatofitose na larva pode não ser efetiva, dependendo da maneira como acontecer a inoculação (injeção ou pulverização superficial).
- ❖ A viabilidade das larvas pode não ser adequada e suficiente até a finalização dos experimentos e análises.
- ❖ Apesar das dificuldades encontradas para desenvolver esse modelo alternativo de infecção, os experimentos geraram dados para análise e discussão.
- ❖ O uso de larvas de *Tenebrio molitor* como modelo de infecção esbarra em dificuldades, tais como a necessidade de otimizar as condições de cultivo e manutenção das larvas, a padronização dos protocolos experimentais e a validação dos resultados obtidos em modelos animais tradicionais.
- ❖ Uma das principais limitações dos testes de compostos azólicos contra dermatófitos é a possibilidade de surgimento de resistência antifúngica, comprometendo a eficácia do tratamento a longo prazo.
- ❖ Outra limitação é a variabilidade na sensibilidade dos dermatófitos aos compostos tiazólicos. Diferentes espécies desses fungos podem apresentar níveis variados de sensibilidade aos compostos, o que pode afetar os resultados dos testes e a interpretação dos dados.
- ❖ Os compostos tiazólicos podem apresentar toxicidade para o hospedeiro ou causar efeitos adversos, especialmente quando administrados em doses elevadas ou por períodos prolongados. Isso pode limitar a sua aplicabilidade clínica e levantar preocupações sobre a segurança do tratamento.

- ❖ A avaliação da eficácia desses compostos azólicos para dermatófitos em modelos animais pode ser desafiadora devido à complexidade das interações hospedeiro-patógeno e à dificuldade de reproduzir fielmente as condições clínicas em um ambiente experimental.
- ❖ Os ensaios dos compostos azólicos podem enfrentar dificuldades na avaliação da penetração do antifúngico no tecido afetado e na erradicação de biofilmes de dermatófitos, que podem conferir resistência aos tratamentos convencionais.
- ❖ A viabilidade clínica e farmacológica dos compostos tiazólicos também deve ser considerada. Além da eficácia antifúngica, é importante avaliar a estabilidade química, a biodisponibilidade e a farmacocinética dos compostos para garantir sua aplicabilidade prática no tratamento de infecções fúngicas cutâneas.
- ❖ Por fim, os testes de compostos azólicos para dermatófitos podem fornecer apenas uma visão parcial da eficácia do tratamento. Estudos complementares, como ensaios de sinergia com outros agentes antifúngicos ou avaliação da atividade em modelos alternativos de infecção, podem ser necessários para uma compreensão mais abrangente do potencial terapêutico desses compostos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, Susan M. *et al.* The prevalence of infections with *Trichophyton tonsurans* in schoolchildren: the CAPITIS study. **Pediatrics**, v. 125, n. 5, p. 966-973, 2010.
- ABRAMS, WILLIAM R.; DIAMOND, LAWRENCE W.; KANE, AGNES B. A flow cytometric assay of neutrophil degranulation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 737-744, 1983.
- AHAMEFULE, Chukwuemeka Samson *et al.* *Caenorhabditis elegans* as an infection model for pathogenic mold and dimorphic fungi: Applications and challenges. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 751947, 2021.
- ALTHAGAFI, Ismail; EL-METWALY, Nashwa; FARGHALY, Thoraya A. New series of thiazole derivatives: synthesis, structural elucidation, antimicrobial activity, molecular modeling and MOE docking. **Molecules**, v. 24, n. 9, p. 1741, 2019.
- ANDRADE, Crislany de Lima Barbosa. Aspectos biológicos, morfometria e técnica de criação de *Abaris basistriata* Chaudoir, 1873 e *Selenophorus seriatoporus* Putzeys, 1878 (Coleoptera: carabidae). 2014.
- ARUNA, G. L. Development and diagnostic evaluation of indirect enzyme linked immunosorbent assay for *Epidermophyton floccosum* infection in humans. **International Immunopharmacology**, v. 124, p. 110910, 2023.
- ASBRACI (Associação Brasileira de Criadores de Insetos). **Cartilha de criação de Tenébrio molitor para iniciantes**, 2021. Disponível em: http://estaticog1.globo.com/2021/05/20/apostila_de_criacao_de_tenbrioo_molitor_para_globo_rural_final_1.pdf?_ga=2.164795513.759301349.1627062524-1867079401.1612893133. Acesso em: 26 fev. 2024.
- BADALI, Hamid *et al.* In vitro susceptibility patterns of clinically important *Trichophyton* and *Epidermophyton* species against nine antifungal drugs. **Mycoses**, v. 58, n. 5, p. 303-307, 2015.
- BALDO, Aline *et al.* Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 218-223, 2012.
- BALTAZAR, Ludmila de Matos *et al.* IFN- γ impairs *Trichophyton rubrum* proliferation in a murine model of dermatophytosis through the production of IL-1 β and reactive oxygen species. **Medical mycology**, v. 52, n. 3, p. 293-302, 2014.
- BEGUM, Jubeda *et al.* Recent advances in the diagnosis of dermatophytosis. **Journal of basic microbiology**, v. 60, n. 4, p. 293-303, 2020.
- BITENCOURT, Tamires Aparecida *et al.* Extracellular vesicles from the dermatophyte *Trichophyton interdigitale* modulate macrophage and keratinocyte functions. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2343, 2018.

BITENCOURT, Tamires A. *et al.* StuA-regulated processes in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*: Transcription profile, cell-cell adhesion, and immunomodulation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 643659, 2021.

BORTOLUZZI, Paolo; BONESCHI, Vinicio; VERALDI, Stefano. "Mask" Tinea: An Increasing Infection during COVID-19 Pandemic. **Mycopathologia**, p. 1-2, 2022.

BROWN, Alistair JP; HAYNES, Ken; QUINN, Janet. Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. **Current opinion in microbiology**, v. 12, n. 4, p. 384-391, 2009.

BUNYARATAVEJ, Sumanas *et al.* A resurgence of Tinea cruris caused by *Epidermophyton floccosum*: An outbreak among Thai naval cadets. **Journal of Medical Mycology**, v. 34, n. 1, p. 101457, 2024.

CAMBIER, Ludivine; HEINEN, Marie-Pierre; MIGNON, Bernard. Relevant animal models in dermatophyte research. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1, p. 229-240, 2017.

CARRILLO MUÑOZ, Alfonso Javier *et al.* Combination antifungal therapy: A strategy for the management of invasive fungal infections. 2014.

CATALÁN-GONZÁLEZ, Mercedes; MONTEJO-GONZÁLEZ, Juan Carlos. Farmacodinamia y farmacocinética de la micafungina en adultos, niños y neonatos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 1, p. 23-34, 2009.

CHALK, R; SULIAMAN, W. Y. Antimicrobial peptides from small insects. In: **Techniques in insect immunology**. Fair Haven: SOS Publications, 1998. p.109-124.

CHINNAPUN, Dutsadee. Virulence factors involved in pathogenicity of dermatophytes. **Walailak Journal of Science and Technology (WJST)**, v. 12, n. 7, p. 573-580, 2015.

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

COELHO, José Leonardo Gomes *et al.* Dermatofito: resistência a antifúngicos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 74675-74686, 2020.

CORNELY, Oliver A. *et al.* Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. **The Lancet infectious diseases**, v. 19, n. 12, p. e405-e421, 2019.

COSTA-ORLANDI, Caroline Barcelos *et al.* Prevalence of dermatomycosis in a Brazilian tertiary care hospital. **Mycopathologia**, v. 174, n. 5, p. 489-497, 2012.

CRUZ, Maria João *et al.* A IMPORTÂNCIA DA GRISEOFULVINA NO TRATAMENTO DA TINHA DO COURO CABELUDO EM IDADE PEDIÁTRICA—A PROPÓSITO DE UM CASO CLÍNICO. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, v. 69, n. 4, p. 627-627, 2011.

DA COSTA, Bárbara *et al.* *Drosophila melanogaster* as a model of systemic dermatophytosis. **Mycoses**, v. 66, n. 10, p. 906-910, 2023.

DALLA LANA, Daiane Flores *et al.* Dermatofitoses: agentes etiológicos, formas clínicas, terapêutica e novas perspectivas de tratamento. **Clinical and biomedical research**. Vol. 36, n. 4 (2016), p. 230-241, 2016.

DE AGUIAR, Lara *et al.* Dermatofitose: clínica, diagnóstico e tratamento. **Atualidades em micologia médica**, 2022.

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 JESUS, Maria José Santos; SOUSA, Zulane Lima. Pesquisa de fungos dermatófitos em amostras de solo de parques recreacionais da cidade de Ilhéus, Bahia. **Revista Cereus**, v. 12, n. 1, p. 77-90, 2020.

DE LACORTE SINGULANI, Junya *et al.* Evaluation of the efficacy of antifungal drugs against *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* in a *Galleria mellonella* model. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48, n. 3, p. 292-297, 2016.

DE SA, Nívea Pereira *et al.* Thiazole derivatives act on virulence factors of *Cryptococcus* spp. **Medical Mycology**, v. 57, n. 1, p. 84-91, 2019.

DE SOUZA, Patrícia Canteri *et al.* *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. *Journal of microbiological methods*, v. 118, p. 182-186, 2015.

DEL PALACIO, Amalia *et al.* Trends in the treatment of dermatophytosis. **Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, País Vasco, Spain**, p. 148-158, 2000.

DELATTIN, Nicolas; CAMMUE, Bruno PA; THEVISSSEN, Karin. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. **Future medicinal chemistry**, v. 6, n. 1, p. 77-90, 2014.

DENG, Shuwen *et al.* Comparison of the in vitro activities of newer triazoles and established antifungal agents against *Trichophyton rubrum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 4312-4314, 2015.

DENG, Weiwei *et al.* Differential gene expression in HaCaT cells may account for the various clinical presentation caused by anthropophilic and geophilic dermatophytes infections. **Mycoses**, v. 63, n. 1, p. 21-29, 2020.

DERMATOFITOSE. Copyright Sociedade Brasileira de Dermatologia. 2021.
Disponível em: <https://www.sbd.org.br/doencas/dermatofitose-2/>

DINIZ, Laura Cristina Lima. **Identificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae)**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DIOMEDI, P. *et al.* Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. **Revista chilena de infectología**, v. 21, n. 2, p. 89-101, 2004.

DOGRA, Sunil; NARANG, Tarun. Emerging atypical and unusual presentations of dermatophytosis in India. **Clinical Dermatology Review**, v. 1, n. Suppl 1, p. S12-S18, 2017.

DUARTE, Jucelio Peter. Impacto de diferentes estresses no peso e estado imunológico em *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758)(Blattaria, Blattidae). Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Entomologia. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2015.

ELEWSKI, Boni E. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 415-429, 1998.

ESPINEL-INGROFF, Ana; CANTÓN, Emilia; PEMÁN, Javier. Antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, p. 41-50, 2012.

FALCI, Diego Rodrigues; PASQUALOTTO, Alessandro Comaru. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical and biomedical research. Porto Alegre. Vol. 35, n. 2,(2015), p. 65-82**, 2015.

FAWAY, Emilie *et al.* Towards a Standardized Procedure for the Production of Infective Spores to Study the Pathogenesis of Dermatophytosis. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 12, p. 1029, 2021.

FAWAY, Émilie; LAMBERT DE ROUVROIT, Catherine; POUMAY, Yves. In vitro models of dermatophyte infection to investigate epidermal barrier alterations. **Experimental dermatology**, v. 27, n. 8, p. 915-922, 2018.

FONSECA-GÓMEZ, Angy Julieth; URBANO-CÁCERES, Eliana Ximena; ZANGUÑA-FONSECA, Luisa Fernanda. Tinea pedis y onicomicosis: prevalencia en futbolistas. **Dermatologia Revista Mexicana**, v. 66, n. 5, 2022.

GEORGOPAPADAKOU, Nafsika H.; TKACZ, Jan S. The fungal cell wall as a drug target. **Trends in microbiology**, v. 3, n. 3, p. 98-104, 1995.

GHANNOUM, Mahmoud. Azole resistance in dermatophytes: prevalence and mechanism of action. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 106, n. 1, p. 79-86, 2016.

GRUMBT, Maria *et al.* Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 6, p. 1550-1555, 2013.

GUPTA, Aditya K.; STEC, Nadia. Recent advances in therapies for onychomycosis and its management. **F1000Research**, v. 8, 2019.

HAVLICKOVA, Blanka; CZAICA, Viktor A.; FRIEDRICH, Markus. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, v. 51, p. 2-15, 2008.

HAYETTE, Marie-Pierre; SACHELI, Rosalie. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, n. 3, p. 164-179, 2015.

HO, Fritz Ka-Ho; DELGADO-CHARRO, M. Begoña; BOLHUIS, Albert. Evaluation of an explanted porcine skin model to investigate infection with the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v. 185, p. 233-243, 2020.

ILKIT, Macit; DURDU, Murat. Tinea pedis: the etiology and global epidemiology of a common fungal infection. **Critical reviews in microbiology**, v. 41, n. 3, p. 374-388, 2015.

JACOB, Tiago R. *et al.* rpb2 is a reliable reference gene for quantitative gene expression analysis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology**, v. 50, n. 4, p. 368-377, 2012.

KANDEMIR, Hazal *et al.* Polyphasic discrimination of *Trichophyton tonsurans* and *T. equinum* from humans and horses. **Mycopathologia**, v. 185, n. 1, p. 113-122, 2020.

KANE, Julius. **Laboratory handbook of dermatophytes: a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails**. StAR publishing company, 1997.

KESHWANIA, Puja *et al.* Superficial Dermatophytosis across the World's Populations: Potential Benefits from Nanocarrier-Based Therapies and Rising Challenges. **ACS omega**, v. 8, n. 35, p. 31575-31599, 2023.

KHURANA, Ananta; SARDANA, Kabir; CHOWDHARY, Anuradha. Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. **Fungal Genetics and Biology**, v. 132, p. 103255, 2019.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACARI, E. M.; MELO, N. T. Micoses superficiais. In: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. 9ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 252-352.

LAUTERT, Claudia *et al.* EFICÁCIA DA CASPOFUNGINA EM FUNGOS FILAMENTOSOS. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 2, p. 175-186, 2011.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002.

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

Lei nº 11.794, de 08 de Outubro de 2008. Disponível em:
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm

LEWIS, Russell E. *et al.* Assessment of antifungal activities of fluconazole and amphotericin B administered alone and in combination against *Candida albicans* by using a dynamic in vitro mycotic infection model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 6, p. 1382-1386, 1998.

LI, De-Dong *et al.* Using *Galleria mellonella*–*Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 9, p. 1482-1487, 2013.

LIONAKIS, Michail S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 521-527, 2011.

LOZOYA-PÉREZ, Nancy E. *et al.* Influences of the culturing media in the virulence and cell wall of *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix brasiliensis*, and *Sporothrix globosa*. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 323, 2020.

LOZOYA-PÉREZ, Nancy E. *et al.* *Tenebrio molitor* as an alternative model to analyze the *Sporothrix* species virulence. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 2059-2072, 2021.

MA, Xiaoping *et al.* *Microsporium gypseum* Isolated from *Ailuropoda melanoleuca* Provokes Inflammation and Triggers Th17 adaptive immunity response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 12037, 2022.

MAGALHÃES, Isadora Borges; DE MOURA, Rodrigo Scaliante. DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR *CANDIDA ALBICANS* EM LARVAS DE *TENEBRIO MOLITOR*. **Anais do Programa de Iniciação Científica da UniEVANGÉLICA**, v. 11, p. 164-167, 2021.

MARANHÃO, Fernanda CA *et al.* Membrane transporter proteins are involved in *Trichophyton rubrum* pathogenesis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 163-168, 2009.

MARTINEZ, Diego A. *et al.* Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection. **MBio**, v. 3, n. 5, p. e00259-12, 2012.

MARTINEZ-ROSSI, Nilce M. *et al.* Dermatophyte resistance to antifungal drugs: mechanisms and prospectus. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 374718, 2018.

MARTINEZ-ROSSI, Nilce M. *et al.* State-of-the-art dermatophyte infections: epidemiology aspects, pathophysiology, and resistance mechanisms. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 8, p. 629, 2021.

MARTINEZ-ROSSI, Nilce M.; PERES, Nalu T.A.; ROSSI, Antonio. Pathogenesis of dermatophytosis: sensing the host tissue. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1, p. 215-227, 2017.

MERCER, Derry K.; STEWART, Colin S. Keratin hydrolysis by dermatophytes. **Medical mycology**, v. 57, n. 1, p. 13-22, 2019.

METIN, Banu; HEITMAN, Joseph. She loves me, she loves me not: on the dualistic asexual/sexual nature of dermatophyte fungi. **Mycopathologia**, v. 185, n. 1, p. 87-101, 2020.

NECKERS, Len; WORKMAN, Paul. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet?. **Clinical cancer research**, v. 18, n. 1, p. 64-76, 2012.

NOBRE, Márcia de Oliveira *et al.* Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v. 32, p. 175-184, 2002.

OLIVEIRA, Jeferson C. D. **Tópicos em Micologia Médica**. 4ª Edição. Rio de Janeiro. 230 págs. 2014.

OLSEVER, Vanessa *et al.* Prevalência de dermatofitoses no Rio Grande do Sul no período de 2007-2011. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 16, n. 4, 2014.

ORSOLIN, Dannyelle Cristine; SILVA, Marco Aurélio Tramontin. DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *Tenebrio molitor* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) EM CONDIÇÃO DE LABORATÓRIO. **SEPE-Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFFS**, v. 8, n. 1, 2018.

PEREIRA, R. *et al.* Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 11-22, 2021.

PETRUCELLI, Monise Fazolin *et al.* Dual RNA-Seq analysis of *Trichophyton rubrum* and HaCat keratinocyte co-culture highlights important genes for fungal-host interaction. **Genes**, v. 9, n. 7, p. 362, 2018.

PETRUCELLI, Monise Fazolin *et al.* Epidemiology and diagnostic perspectives of dermatophytoses. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 310, 2020.

PERES, Nalu T. D. A. *et al.* Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais brasileiros de Dermatologia**, v. 85, p. 657-667, 2010.

PERES, Nalu T. D. A. *et al.* In vitro and ex vivo infection models help assess the molecular aspects of the interaction of *Trichophyton rubrum* with the host milieu. **Sabouraudia**, v. 54, n. 4, p. 420-427, 2016.

PERES, Nalu T. D. A. *et al.* The bZIP Ap1 transcription factor is a negative regulator of virulence attributes of the anthropophilic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 3, p. 100132, 2022.

PIRES, Carla A. A. *et al.* Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, p. 259-264, 2014.

REIS-GOMES, Angelita *et al.* Dermatopatias fúngicas: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. **Acta veterinaria brasílica**, v. 6, n. 4, p. 272-284, 2012.

REVIE, Nicole M. *et al.* Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 70-76, 2018.

RIZZO, Juliana *et al.* Analysis of multiple components involved in the interaction between *Cryptococcus neoformans* and *Acanthamoeba castellanii*. **Fungal biology**, v. 121, n. 6-7, p. 602-614, 2017.

RUBENICK, Jaqueline Bandeira *et al.* Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de griseofulvina matéria-prima. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 3, p. 243-249, 2013.

SÁ, Nívea Pereira de *et al.* Heterocycle thiazole compounds exhibit antifungal activity through increase in the production of reactive oxygen species in the *cryptococcus neoformans-cryptococcus gattii* species complex. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. 10.1128/aac.02700-16, 2017.

SIDRIM, J. J. C.; MEIRELES, T. E. F.; OLIVEIRA, L. M. P.; DIÓGENES, M. J. N. Aspectos clínico-laboratoriais das dermatofitoses. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. cap. 14, p. 135-161.

SILVA, Karen Beatriz *et al.* PROTEÍNAS ALTERNATIVAS COMO INGREDIENTE DE ENRIQUECIMENTO DE ALIMENTOS: UMA REVISÃO DA LARVA DE TENÉBRIO COMUM (TENEBRIO MOLITOR). **CIÊNCIAS AGRÁRIAS: O AVANÇO DA CIÊNCIA NO BRASIL-VOLUME 2**, v. 2, n. 1, p. 79-97, 2021.

SINHA, Shweta; DOBLE, Mukesh; MANJU, S. L. Design, synthesis and identification of novel substituted 2-amino thiazole analogues as potential anti-inflammatory agents targeting 5-lipoxygenase. **European journal of medicinal chemistry**, v. 158, p. 34-50, 2018.

SIQUEIRA, Emersom R. *et al.* Ocorrência de dermatófitos em amostras de unhas, pés e mãos coletadas de estudantes universitários. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 269-271, 2006.

SIQUEIRA LEMOS, Patrícia Ferraccioli *et al.* INFECÇÕES FÚNGICAS CUTÂNEAS PODOAIS COMO PREDITORAS DE COMPLICAÇÕES EM PESSOAS COM DIABETES: UMA REVISÃO INTEGRATIVA. **Revista de Enfermagem e Atenção à Saúde-Reas**, v. 10, n. 2, 2021.

SONG, Xun *et al.* In vivo antifungal activity of dipyrithione against *Trichophyton rubrum* on guinea pig dermatophytosis models. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 558-564, 2018.

SPANG, Brian. **Insects as food: Assessing the food conversion efficiency of the mealworm (*Tenebrio molitor*)**. 2013. Tese de Doutorado. Evergreen State College.

TAFAREL, Tamara Aline. ***Tenebrio molitor* L.(Coleoptera: tenebrionidae) e suas aplicações no controle biológico e na alimentação animal: uma revisão**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

TAKATORI, K.; ICHIJO, S. Human dermatophytosis caused by *Trichophyton equinum*. **Mycopathologia**, v. 90, n. 1, p. 15-19, 1985.

TAVARES, Nathália Vieira *et al.* Kérion Celsi: importante diagnóstico diferencial para as dermatofitoses/Kérion Celsi: important differential diagnosis for dermatophytosis. **Braz. J. Hea. Rev.[Internet]**, v. 4, n. 3, p. 12721-3, 2021.

TREIBER, Annemarie; PITTERMANN, Wolfgang; SCHUPPE, Hans-Christian. Efficacy testing of antimycotic prophylactics in an animal model. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 204, n. 4, p. 239-243, 2001.

TREVIJANO-CONTADOR, Nuria; ZARAGOZA, Oscar. Expanding the use of alternative models to investigate novel aspects of immunity to microbial pathogens. **Virulence**, v. 5, n. 4, p. 454-456, 2014.

VAEZI, Afsane *et al.* In vitro antifungal activity of amphotericin B and 11 comparators against *Aspergillus terreus* species complex. **Mycoses**, v. 61, n. 2, p. 134-142, 2018.

VENTURINI, James *et al.* Dermatophyte–host relationship of a murine model of experimental invasive dermatophytosis. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 13, p. 1144-1151, 2012.

VIANI, F. C. *et al.* Production of extracellular enzymes by *Microsporum canis* and their role in its virulence. **Medical Mycology**, v. 39, n. 5, p. 463-468, 2001.

WEITZMAN, Irene; SUMMERBELL, Richard C. The dermatophytes. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 2, p. 240-259, 1995.

WHITE, Theodore C. *et al.* Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 8, p. 1238-1245, 2008.