



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Larissa Beatriz Silva

Identificação e determinação do perfil de suscetibilidade a antifúngicos de leveduras e fungos filamentosos isolados de dermatomicoses e avaliação da produção de proteinases e fosfolipases pelas leveduras

Uberaba - MG
2012

LARISSA BEATRIZ SILVA

Identificação e determinação do perfil de suscetibilidade a antifúngicos de leveduras e fungos filamentosos isolados de dermatomicoses e avaliação da produção de proteinases e fosfolipases pelas leveduras

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração II: Imunologia, Microbiologia e Parasitologia.

Orientador: Prof^o Dr. Anderson Assunção Andrade

Uberaba - MG
2012

LARISSA BEATRIZ SILVA

IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE DERMATOMICOSSES E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEINASES E FOSFOLIPASES PELAS LEVEDURAS

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação da Banca Examinadora para a obtenção do Título de:

MESTRE EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

e aprovada na sua versão final em 19 de abril de 2012, atendendo às normas da legislação vigente da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de concentração II: Microbiologia, Parasitologia e Imunologia.



Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva
Coordenador do CPGCF/UFTM

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Anderson Assunção Andrade
Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM



Profª. Drª. Maria do Rosário Rodrigues Silva
Universidade Federal de Goiás - UFG



Prof. Dr. Mario León Silva-Vergara
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

Dedico este trabalho aos meus pais, Selma e Raulino por acreditarem e lutarem por meu sonho e por todo incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A **Deus**, por ser fiel e me capacitar, por me confortar nos momentos de dificuldade. Tu És a vida e a força que há em mim e quanto mais eu precisei mais a Tua mão me alcançou.

Aos meus pais, **Selma e Raulino**, meus alicerces e exemplos de vida. Agradeço pelas orações, pelo incentivo, por me ensinarem a persistir, acreditar e lutar pelos meus sonhos. Por me mostrarem o valor da disciplina, responsabilidade e honestidade.

Aos meus irmãos, **Felipe e Andreza**, pelo companheirismo e compreensão.

Ao **Prof. Dr. Anderson Assunção Andrade**, meu orientador, pela oportunidade, confiança, paciência e toda dedicação. Você se fez presente em todos os momentos e não mediu esforços para me ajudar. Nunca me esquecerei de suas palavras em um momento de ansiedade e medo: “Eu sou seu orientador e estou aqui para te ajudar... Vai dar tudo certo”. Obrigada pelo exemplo de humildade, companheirismo, responsabilidade, dedicação e profissionalismo. Que Deus abençoe você e toda sua família.

Ao **Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva** pela amizade, ensinamentos, colaboração e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório da Disciplina de Microbiologia **Maxelle, Ana Carolina, Beatriz, Natália, Fernanda, Aline, Renata, Patrícia e Elisson**. Foi um presente de Deus ter vocês durante essa jornada. Amizades importantes para a realização deste trabalho, para a vida toda.

Àos companheiros da micologia, **Prof. Dr. Mario León Silva-Vergara, Kennio, Leonardo e Délio**, pelo apoio, ajuda e ensinamentos.

Aos alunos de Iniciação Científica, **Diego, Rodrigo, Thaís e Igor**, pela paciência, dedicação, respeito, confiança e amizade.

Aos amigos de todo sempre, **Thaís, Morgane e Cleiton**, que são socorro na hora certa e torcem muito por mim.

À **Sônia Caiado**, por ser minha super mãe na microbiologia. Obrigada pelo carinho, incentivo e conselhos.

Aos funcionários, **Dona Miguela, Leila, Sueli e Celso**, pelo carinho e amizade.

À querida **Beth**, secretária do Curso de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, por todo apoio, carinho e dedicação.

Ao **Curso de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da UFTM** pela oportunidade.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)** e a **Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU)** pelo apoio financeiro.

... Até aqui nos ajudou o SENHOR.

(I Samuel 7:12)

RESUMO

Silva, LB.[dissertação]. Identificação e determinação do perfil de suscetibilidade a antifúngicos de leveduras e fungos filamentosos isolados de dermatomicoses e avaliação da produção de proteinases e fosfolipases pelas leveduras. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2012.

Dermatomicoses são doenças fúngicas localizadas na pele, unhas e pelos que afetam de 20 a 25% da população mundial. A prevalência destas infecções varia de acordo com as diferenças regionais e atualmente elas são consideradas importantes problemas de saúde pública em algumas regiões do mundo. Dermatomicoses podem ser causadas por leveduras, dermatófitos e fungos filamentosos não-dermatófitos. O tratamento das micoses dermatológicas baseia-se no uso de antifúngicos tópicos e/ou orais, mas a ocorrência de falha terapêutica é comum e casos de resistência aos fármacos têm sido relatados. Os objetivos deste trabalho foram identificar e determinar o perfil de suscetibilidade a antifúngicos de leveduras e fungos filamentosos isolados de dermatomicoses na cidade de Uberaba-MG, e avaliar a produção de proteinases e fosfolipases pelas leveduras. As amostras de fungos foram obtidas de pacientes atendidos no serviço de patologia clínica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro ou em laboratório particular de Uberaba. Os fungos foram identificados por métodos clássicos e a suscetibilidade *in vitro* a antifúngicos foi avaliada por microdiluição em caldo segundo preconizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) nos documentos M38-A2 e M27-A3. Os antifúngicos testados foram cetoconazol, fluconazol, griseofulvina, itraconazol, terbinafina e voriconazol. A produção de fosfolipases e proteinases foi analisada nas leveduras. Entre Julho de 2009 a Julho de 2011 foram analisadas 216 amostras, sendo que a maioria foi proveniente de indivíduos do sexo feminino e de adultos com idade entre 31-60 anos. A infecção mais frequente foi a onicomicose seguida de *tinea pedis* e *tinea corporis*. Foram isoladas leveduras (53,7%), dermatófitos (32,4%) e fungos filamentosos não-dermatófitos (13,9%), e as espécies mais comuns foram *Candida parapsilosis* (24,07%), *Trichophyton rubrum* (17,13%), *Trichophyton interdigitale* (11,12%) e *Candida guilliermondii* (11,12%). A maioria das leveduras foi sensível aos antifúngicos, embora suscetibilidade dose-dependente tenha sido encontrada, principalmente ao itraconazol. A terbinafina foi o composto mais ativo contra dermatófitos e o fluconazol apresentou a menor atividade contra estes fungos. Fungos filamentosos não-dermatófitos apresentaram os maiores valores de concentração inibitória mínima (CIM) para todos os antifúngicos. Dos isolados de *Candida* spp., 29,8% foram capazes de produzir fosfolipases e 42,3% produziram proteinases. Dentre os isolados de *Trichosporon* spp., 66,7% foram produtores de fosfolipases e 16,67% produtores de proteinases. Nossos resultados não mostraram correlação entre a origem clínica dos isolados e sua capacidade de produzir exoenzimas. Os resultados obtidos sugerem que a identificação de fungos e a realização dos testes de suscetibilidade a antifúngicos são procedimentos que poderiam contribuir para o sucesso da terapia das dermatomicoses.

Palavras-Chave: dermatomicoses - suscetibilidade - antifúngicos – virulência

ABSTRACT

Silva, LB.[dissertation]. Identification and determination of antifungal susceptibility profile of yeasts and filamentous fungi isolated from dermatomycosis and evaluation of production of phospholipases and proteinases by yeasts. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2012.

Dermatomycosis are fungal infections localized in the skin, nails and hair that affect about 20 to 25% of the worldwide population. The prevalence of these infections varies according with the difference regionals and currently they have been considered an important public health issue in some regions of the world. Dermatomycosis can be caused by yeast, dermatophytes and non-dermatophyte filamentous fungi. The treatment of dermatological mycosis is based in the use of topical and/or oral antifungals however, the occurrence of treatment failure is common and cases of antifungal drug resistance have been reported. The aims of this study were to identify and determine the antifungal susceptibility profile of yeast and filamentous fungi isolated from dermatomycosis in the Uberaba-MG, and to evaluate the production of proteinases and phospholipases by yeasts. The fungal samples were obtained from patients attended in the service of clinical pathology of Universidade Federal do Triângulo Mineiro or in private laboratory of Uberaba. The fungi were identified by using classical methods and the *in vitro* antifungal susceptibility testing was evaluated by broth microdilution according recommended by the *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)* by documents M27-A3 and M38-A2. Antifungal agents tested included ketoconazole, fluconazole, griseofulvin, itraconazole, terbinafine and voriconazole. The production of phospholipases and proteinases was analyzed for yeasts. Between July 2009 to July 2011 were analyzed 216 samples of which the majority was from women and adults between 31 to 60 years. The most common infection was onychomycosis followed by *tinea pedis* and *tinea corporis*. The fungi isolated were yeast (53.7%), dermatophytes (32.4%) and non-dermatophyte filamentous fungi (13.9%), and the most common species were *Candida parapsilosis* (24.07%), *Trichophyton rubrum* (17.13%), *Trichophyton interdigitale* (11.12%) and *Candida guilliermondii* (11.12%). The most of yeasts were susceptible to antifungals although susceptibility dose dependent has been found, mainly to itraconazole. Terbinafine was the most active compound against dermatophytes and the fluconazole showed the lower activity against these fungi. Non-dermatophyte filamentous fungi showed the highest minimum inhibitory concentration (MIC) values to all antifungal agents. Of all *Candida* spp. evaluated, 29.8% were able to produce phospholipases and 42.3% produced proteinases. Among *Trichosporon* spp., 66.7% were producers of phospholipases and 16.67% producers of proteinases. However, our results did not relationship between the clinical origin of the isolates and their ability to produce exoenzymes. These data suggest that the identification of fungi and the antifungal susceptibility testing are procedures that could contribute to the success of therapy of dermatomycosis.

Key-Words: dermatomycosis - susceptibility - antifungals - virulence

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Microcultivo de levedura em ágar fubá (A) e de fungo filamentoso em ágar batata dextrose (B).....	38
Figura 2: Teste de microdiluição em caldo de fungo dermatófito.....	42
Figura 3: Avaliação da produção de exoenzimas.....	44
Figura 4: Aspecto macroscópico de leveduras isoladas de pacientes cultivadas em ágar Sabouraud dextrose.....	47
Figura 5: Análise microscópica das estruturas de leveduras visualizadas em objetiva de 40X após cultivo em ágar fubá.....	48
Figura 6: Identificação de <i>Candida parapsilosis</i>	48
Figura 7: Distribuição percentual de espécies de <i>Candida</i> isoladas de lesões dermatológicas.....	49
Figura 8: Aspecto macroscópico das colônias de fungos filamentosos em ágar Sabouraud.....	49
Figura 9: Estruturas microscópicas de fungos filamentosos cultivados em ágar batata dextrose observadas em aumento de 1250X.....	50
Figura 10: Identificação de <i>Trichophyton interdigitale</i>	50
Figura 11: Distribuição percentual de fungos filamentosos isolados de lesões dermatológicas.....	51
Figura 12: Distribuição percentual das 216 amostras de fungos isolados de dermatomicoses.....	51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Dermatofitoses humanas: principais manifestações clínicas e respectivas espécies de dermatófitos envolvidas.....19
- Tabela 2:** Pontos de corte em $\mu\text{g/ml}$ para *Candida* spp. contra os agentes antifúngicos segundo o protocolo do CLSI, M27-A3 (2008).....41
- Tabela 3:** Caracterização dos pacientes com dermatomicoses segundo a faixa etária e o sexo.....45
- Tabela 4:** Distribuição das dermatomicoses de acordo com sua localização e idade dos pacientes.....46
- Tabela 5:** Distribuição das dermatomicoses segundo o local de infecção e o sexo.....46
- Tabela 6:** Fungos isolados de lesões dermatológicas segundo o local de infecção e o agente etiológico.....53
- Tabela 7:** Suscetibilidade *in vitro* de leveduras isoladas de infecções dermatológicas frente a 5 antifúngicos.....55
- Tabela 8:** Atividade *in vitro* de agentes antifúngicos para 100 amostras de fungos filamentosos isolados de lesões dermatológicas.....57
- Tabela 9:** Atividade de fosfolipases e proteinases das 116 leveduras isoladas.....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABD	Ágar batata dextrose
ASD	Ágar Sabouraud dextrose
ATCC	<i>American type culture collection</i>
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTZ	Cetoconazol
DC	Diâmetro da colônia
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Diâmetro da colônia mais a zona de precipitação formada
FFND	Fungos filamentosos não-dermatófitos
FLZ	Fluconazol
g	Gramas
g/L	Gramas por litro
GRI	Griseofulvina
HCl	Ácido clorídrico
ITZ	Itraconazol
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio
KNO ₃	Nitrato de potássio
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mg	Miligrama
mol/L	Mol por litro
MOPS	Ácido morfolinopropanossulfônico
NaCl	Cloreto de sódio
N	Normal
n	Tamanho da amostra em número absoluto
nm	Nanômetro
ph	Potencial hidrogeniônico

Pz	Zona de precipitação
RPMI	<i>Meio Roswell Park Memorial Institute</i>
Sap	Proteinase aspartil secretora
SAB	Soro albumina bovina
sp.	Espécie
spp.	Espécies
TER	Terbinafina
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
YCB	<i>Yeast Carbon Base</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µg/mL	Micrograma por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 PRINCIPAIS FUNGOS ASSOCIADOS A DERMATOMICOSSES	17
1.1.1 Fungos Filamentosos	17
1.1.1.1 Dermatófitos	17
1.1.1.2 Fungos Filamentosos não-dermatófitos (FFND)	19
1.1.1.2.1 <i>Fusarium</i> spp.	20
1.1.1.2.2 <i>Scytalidium</i> spp.	21
1.1.1.2.3 <i>Alternaria</i> spp.	21
1.1.1.2.4 <i>Curvularia</i> spp.	22
1.1.1.2.5 <i>Fonsecaea</i> spp.	22
1.1.2 Leveduras	23
1.1.2.1 <i>Trichosporon</i> spp.	23
1.1.2.2 <i>Candida</i> spp.	24
1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS	25
1.3 TRATAMENTO DAS DERMATOMICOSSES	26
1.4 ENSAIOS DE SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS	29
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 METODOLOGIA	33
4.1 AMOSTRAS CLÍNICAS	33
4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	33
4.2.1 Leveduras	34
4.2.1.1 Teste da urease	34
4.2.1.2 Assimilação de carbono e nitrogênio (Auxanograma)	34
4.2.1.3 Fermentação de carboidratos (Zimograma)	35
4.2.1.4 Análise em meio de cultura cromogênico	36
4.2.1.5 Prova de tubo germinativo	36
4.2.1.5 Microcultivo em lâmina	36
4.2.2 Fungos Filamentosos	37
4.2.2.1 Microcultivo em lâmina	37
4.2.2.2 Teste da urease	38
4.2.2.3 Ágar <i>Trichophyton</i>	38
4.3 TESTES DE SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS	39
4.3.1 Preparo dos agentes antifúngicos	39
4.3.2 Leveduras	40
4.3.2.1 Preparo do inóculo	40
4.3.2.2 Interpretação dos resultados	40
4.3.3 Fungos Filamentosos	41
4.3.3.1 Preparo do inóculo	41
4.3.3.2 Interpretação dos resultados	42
4.4 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS	43
4.4.1 Proteinase	43
4.4.2 Fosfolipase	43

5 RESULTADOS	45
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DERMATOMICOSSES	45
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	46
5.2.1 Leveduras	47
5.2.2 Fungos Filamentosos	49
5.3 TESTES DE SUSCETIBILIDADE <i>IN VITRO</i>	54
5.3.1 Leveduras	54
5.3.2 Fungos Filamentosos	56
5.4 FATORES DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS	58
5.4.1 Atividade de fosfolipases	58
5.4.2 Atividade de proteinases	58
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÕES	72
8 REFERÊNCIAS	73
ANEXO A	92

1 INTRODUÇÃO

2
3
4 Dermatômicoses são doenças fúngicas localizadas na pele, unhas, pelos, dobras
5 periungueais, conduto auditivo externo, nas mucosas e zonas cutâneo-mucosas. São infecções
6 de ocorrência mundial, com maior prevalência em regiões de clima quente e úmido e
7 acometem tanto os seres humanos quanto animais (PARADA, 2007; WILLE et al., 2009).

8 Estas doenças formam o grupo mais numeroso de infecções micóticas e são
9 consideradas um problema de saúde pública devido à sua alta prevalência, pelos prejuízos que
10 acarretam e pelo impacto sócio-econômico que provocam. As dermatômicoses são
11 consideradas uma das doenças dermatológicas mais comuns na atualidade, afetando de 20 a
12 25% da população mundial (HAVLICKOVA et al., 2008; SIMONNET et al., 2011). Em
13 determinadas profissões como agricultores, empregados de limpeza, jardineiros, dentre outras,
14 as infecções dermatológicas podem ser extremamente dolorosas, desconfortáveis e, às vezes,
15 impedir a realização do trabalho. Profissionais de saúde, trabalhadores de bares, restaurantes,
16 atendentes ao público precisam ser retirados dos postos de trabalho quando acometidos
17 devido a alterações na estética (PONTES et al., 2002; PARADA, 2007).

18 Uma variedade de fungos, tanto filamentosos quanto em forma de leveduras
19 podem causar dermatômicoses. Dentre os fungos filamentosos, os principais agentes
20 etiológicos são os dermatófitos e dentre as leveduras, o gênero *Candida* é o mais comum
21 (NARDIN et al., 2006). Tanto dermatófitos quanto *Candida* spp. possuem a capacidade de
22 degradar a queratina da pele, que serve como sua principal fonte nutricional, sendo chamados
23 de fungos queratinofílicos. Entretanto, fungos não queratinofílicos também podem causar
24 dermatômicoses e atualmente, fungos considerados oportunistas ou fungos filamentosos não-
25 dermatófitos (como *Fusarium* spp., por exemplo) têm sido frequentemente isolados de lesões
26 dermatológicas (CALADO, 2005).

27 Estudos epidemiológicos relatam que a prevalência de fungos responsáveis pelas
28 micoses dermatológicas varia de acordo com as diferenças regionais, clima, características
29 socioeconômicas, hábitos culturais e migração (COSTA et al., 2002; PONTES et al., 2002;
30 CHINELLI et al., 2003; ALMEIDA et al., 2009; KOKSAL et al., 2009; SIMONNET et al.,
31 2011). Observa-se maior frequência de dermatômicoses em comunidades com baixo nível
32 socioeconômico e onde vivem muitas pessoas, o que confere maiores oportunidades para o
33 contato pele a pele, contato com animais e baixas condições de higiene (HAVLICKOVA et
34 al., 2008). Além disto, estes estudos mostram que tanto adultos quanto crianças são afetados e

1 que o uso de calçados fechados, roupas muito justas, a prática de esportes, contato com areia
2 contaminada podem aumentar as chances de infecção (CALADO, 2005).

3 Dermatomicoses são consideradas de difícil tratamento, pois este deve ser
4 realizado por longos períodos juntamente com um programa educativo que exige mudanças
5 de hábitos do indivíduo (cortar os pelos, isolamento apropriado, medidas sanitárias, dentre
6 outras). Além disto, em função da variedade de espécies que podem causar dermatomicoses,
7 cada uma das quais apresentando perfil distinto de suscetibilidade aos antifúngicos, o êxito da
8 terapia é um desafio e depende da adesão ao tratamento. Essa adesão, por sua vez, é um
9 processo multifatorial que necessita da parceria entre profissional de saúde e paciente. Sabe-se
10 ainda que recidivas são frequentes e geralmente são atribuídas à má utilização e/ou
11 descontinuidade do fármaco antifúngico (CAMPANHA et al., 2007; FRIAS e KOZUSNY-
12 ANDREANI, 2009). Somada a estes fatores, atualmente, a resistência aos agentes
13 antifúngicos é considerada uma importante causa de falha no tratamento destas infecções
14 (MUKHERJEE et al., 2003; MARTINEZ-ROSSI et al., 2008; MANZANO-GAYOSSO et al.,
15 2011).

16 Pelo exposto, conhecer as atuais tendências na incidência de fungos causadores
17 das dermatomicoses em diferentes regiões e analisar o perfil de sensibilidade destes fungos
18 aos antifúngicos disponíveis no mercado são fundamentais para contribuir com o diagnóstico
19 e tratamento destas doenças (KOKSAL et al, 2009).

22 1.1 PRINCIPAIS FUNGOS ASSOCIADOS A DERMATOMICOSSES

25 1.1.1 Fungos Filamentosos

28 1.1.1.1 Dermatófitos

31 Os dermatófitos constituem um grupo de fungos que afetam os tecidos
32 queratinizados de seres humanos e outros animais, causando infecções denominadas
33 dermatofitoses ou *tineas* (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995). Mesmo não fazendo parte
34 da microbiota do organismo humano, estes fungos estão bem adaptados para infectar os

1 tecidos queratinizados devido à sua capacidade em utilizar a queratina como fonte de
2 nutrientes (LEMSADDEK, 2008). Dermatofitos compreendem cerca de 40 espécies fúngicas,
3 das quais 20 são as principais responsáveis pelas infecções em humanos (DRAKENSJÖ e
4 CHRYSSANTHOU, 2011). Eles são classificados nos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e
5 *Epidermophyton* e, conforme seu habitat são divididos em antropofílicos (encontrados em
6 associação a seres humanos e seus habitats), zoofílicos (mais frequentemente associados a
7 animais) e geofílicos (isolados no solo) (MURRAY et al., 2004; REZENDE et al., 2008).

8 Fungos do gênero *Trichophyton* apresentam microconídeos em grande quantidade
9 e macroscopicamente suas colônias apresentam uma variedade intensa de cores dependendo
10 da espécie. Dentre os dermatofitos, fungos do gênero *Trichophyton* são os mais comumente
11 isolados e as principais espécies causadoras das dermatofitoses são: *T. rubrum*, *T.*
12 *interdigitale*, *T. tonsurans*, *T. schoenleinii*, *T. soudanense* e *T. violaceum* (TRABULSI e
13 ALTERTHUM, 2005; AKCAGLAR et al., 2011; DRAKENSJÖ e CHRYSSANTHOU,
14 2011). *T. rubrum* é a espécie mais isolada em todo o mundo, seguido de *T. interdigitale*, e
15 estas espécies estão associadas, principalmente, a infecções nas unhas e pés (MUKHERJEE et
16 al., 2003; ROMANO et al., 2005; DRAKENSJÖ e CHRYSSANTHOU, 2011, TSOUMANI
17 et al., 2011). Fungos do gênero *Microsporum* são caracterizados pela presença de
18 macroconídeos fusiformes, multisseptados de paredes rugosas e espessas. Muitas espécies de
19 *Microsporum* estão envolvidas em processos infecciosos humanos e animais na dependência
20 de características geográficas e do hospedeiro. Assim, encontramos *M. canis*, *M. gypseum* e
21 *M. audouinii* como as espécies mais frequentemente isoladas. Além disto, fungos deste
22 gênero estão associados às micoses no couro cabeludo (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005;
23 SEEBACHER et al., 2008; TSOUMANI et al., 2011). Já, os fungos do gênero
24 *Epidermophyton* são caracterizados pela presença de macroconídeos piriformes,
25 multisseptados de paredes lisas e espessas e a única espécie patogênica para seres humanos é
26 o *Epidermophyton floccosum* (BRILHANTE et al., 2000; TRABULSI e ALTERTHUM,
27 2005).

28 As dermatofitoses são classificadas clinicamente segundo as localizações
29 anatômicas afetadas por estes fungos. A denominação de cada tipo de dermatofitose é feita
30 adicionando-se um nome latino, que designa o local do corpo afetado, à palavra *tinea* (Tabela
31 1) (SANTOS et al., 2002; ACHTERMAN e WHITE, 2012).

32 Em todo o mundo, o *M. canis* é segundo patógeno mais frequentemente
33 relacionado à *tinea corporis* e *tinea cruris*. Na Europa e na América do Norte, este
34 dermatofito é o principal agente causal de *tinea capitis* (GUPTA e TU, 2006). De maneira

1 geral, no Brasil, a *tinea capitis* é a infecção mais frequente em crianças e o agente mais
 2 comum também é *M. canis*. Outros tipos de *tineas* são mais frequentes nos adultos sendo o
 3 agente mais comum *T. rubrum* (COSTA et al., 2002; CAMPANHA et al., 2007).

4
 5
 6 **Tabela 1:** Dermatofitoses humanas: principais manifestações clínicas e respectivas espécies de dermatófitos
 7 envolvidas.

Manifestações clínicas	Principais dermatófitos envolvidos
<i>Tinea unguium</i>	<i>T. rubrum</i> , <i>T. interdigitale</i> , <i>E. floccosum</i>
<i>Tinea pedis</i>	<i>T. interdigitale</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>E. floccosum</i>
<i>Tinea corporis</i>	<i>T. rubrum</i> , <i>T. interdigitale</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>M. canis</i> , <i>M. gypseum</i>
<i>Tinea cruris</i>	<i>E. floccosum</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. interdigitale</i>
<i>Tinea capitis</i>	<i>T. tonsurans</i> , <i>M. canis</i> , <i>T. violaceum</i> , <i>M. gypseum</i>
<i>Tinea favus</i>	<i>T. schoenleinii</i>
<i>Tinea barbae</i>	<i>T. verrucosum</i> ; <i>T. interdigitale</i> ; <i>T. violaceum</i>
<i>Tinea manuum</i>	<i>T. rubrum</i> ; <i>T. interdigitale</i> ; <i>M. gypseum</i> ; <i>E. floccosum</i>
<i>Tinea imbricata</i>	<i>T. concentrium</i>

8 Fonte: Modificado de SANTOS et al., 2002.

9
 10
 11 Dermatófitos afetam milhões de indivíduos anualmente e estima-se que cerca de
 12 10 a 15% da população mundial possa ser infectada por estes fungos no decorrer de suas vidas
 13 (BRILHANTE et al., 2000). São responsáveis por 20-25% das dermatomicoses e representam
 14 um problema de saúde pública, principalmente devido ao longo tempo de tratamento e pela
 15 recorrência da infecção (COELHO et al, 2008.; DRAKENSJÖ e CHRYSSANTHOU, 2011).

16 O aspecto clínico das dermatofitoses é muito variável e depende da associação de
 17 fatores como: tipo de fungo, local do corpo infectado bem como a queratinização do local e o
 18 estado imune do hospedeiro. A lesão característica clássica na pele é circular ou “ringworm”,
 19 que geralmente é avermelhada e com bordas elevadas (DEGREEF, 2008).

20 21 22 1.1.1.2 Fungos Filamentosos não-dermatófitos (FFND)

23
 24
 25 FFND constitui um grupo de fungos considerados contaminantes, saprófitos e
 26 oportunistas. Entretanto, para alguns autores estes fungos podem ser considerados patógenos
 27 primários. FFND inclui fungos de diferentes gêneros como *Scopulariopsis* spp., *Scytalidium*
 28 spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Acremonium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp.,

1 *Fonsecaea* spp.e *Curvularia* spp. e a prevalência deles é muito variável. Sabe-se que estes
2 fungos podem ser de distribuição mundial como *Aspergillus* spp., *Scopulariopsis brevicaulis*,
3 *Fusarium* spp. e *Acremonium* spp. ou podem ser encontrados apenas em algumas regiões do
4 mundo como o *Scytalidium dimidiatum* que é encontrado na América do Sul, Caribe, África e
5 Ásia (ELEWSKI, 1998; ESCOBAR e CARMONA-FONSECA, 2003; ROMANO et al, 2005;
6 MARTINS et al., 2007; GARMEDIA et al., 2008; QUEIROZ-TELLES et al., 2009;
7 MOUTRAN, 2012).

8 Nas últimas décadas houve um aumento no número de FFND reconhecidos como
9 agentes de infecções na pele, em seres humanos e animais, e o papel destes fungos como
10 agentes causadores de onicomicoses também tem sido observado (ELEWSKI, 1998;
11 GUGNANI, 2000). Trabalhos têm mostrado que assim como dermatófitos, alguns FFND
12 também podem produzir enzimas, incluindo queratinase e assim, conseguem degradar a
13 queratina. No entanto, o papel patogênico deles não está evidente e seu mero isolamento em
14 culturas não atribui significado etiológico. Desta forma, FFND são associados a infecções
15 quando são encontrados no exame direto e isolados em duas ou mais vezes em cultura, na
16 ausência de outros agentes patogênicos (GUGNANI, 2000; GARMEDIA et al., 2008).

17 A seguir, estão descritas algumas das características de FFNDs encontrados neste
18 trabalho bem como as infecções associadas a eles.

19
20

21 1.1.1.2.1 *Fusarium* spp.

22
23

24 *Fusarium* spp. são fungos filamentosos de crescimento rápido. Suas colônias
25 podem apresentar diferentes cores (branca, rosa, cinza, salmão) e microscopicamente, este
26 gênero é caracterizado pela presença de macro e microconídeos fusiformes em grande
27 quantidade (DIGNANI e ANAISSIE, 2004).

28 Espécies de *Fusarium* são ubíquas e podem ser encontradas no solo, ar e plantas.
29 São patógenos emergentes e podem causar uma variedade de infecções na pele, unhas, feridas
30 cirúrgicas e úlceras existentes e causar infecções disseminadas (CASASA et al., 2006;
31 GUILHERMETTI et al., 2007). Geralmente as infecções disseminadas ocorrem em
32 indivíduos imunossuprimidos e as infecções localizadas em indivíduos imunocompetentes.
33 Nas infecções da pele, a decomposição do tecido por traumas, queimaduras ou outros
34 microrganismos são os principais fatores de risco para a instalação da doença. Ceratites,

1 onicomicoses, peritonite e celulite são as principais manifestações clínicas relacionadas à
2 infecção por *Fusarium* spp. (GUPTA et al, 2000; DIGNANI e ANAISSIE, 2004) e as lesões
3 típicas deste tipo de infecção são avermelhadas como nódulos que podem ulcerar-se. Na unha,
4 *Fusarium* spp. podem causar lesões de vários tipos: proximal, distal, lateral e de superfície
5 branca (ATAÍDES et al., 2011). Além disto, as onicomicoses podem estar associadas a
6 processos inflamatórios. Estes fungos podem invadir as unhas dos pés de indivíduos que
7 caminham descalços ou com sandálias principalmente em solos contaminados. Nestes tipos de
8 infecções, as espécies mais comumente encontradas são *F. oxysporum* e *F. solani* (GUPTA et
9 al., 2000; DIGNANI e ANAISSIE, 2004; CASASA et al., 2006).

10 11 12 1.1.1.2.2 *Scytalidium* spp.

13
14
15 Este gênero foi descrito em 1933 por Natrass como fungos filamentosos
16 fitopatogênicos. No entanto, em 1970 foram descritos casos de infecções cutâneas e ungueais
17 em humanos (ESCOBAR e CARMONA-FONSECA, 2003). *Scytalidium* spp. produz enzimas
18 como amilases, proteases, queratinases e lipases que desempenham importante papel na sua
19 patogenicidade. Devido à presença da queratinase, também conseguem hidrolisar a queratina
20 das unhas e da pele (XAVIER et al., 2010). Estes fungos são importantes agentes causadores
21 de infecções nos membros inferiores e nas unhas e, clinicamente, as lesões causadas não
22 diferem daquelas causadas pelos dermatófitos (LACAZ et al., 1999; ESCOBAR e
23 CARMONA-FONSECA, 2003; XAVIER et al., 2010; CURSI et al., 2011).

24 25 26 1.1.1.2.3 *Alternaria* spp.

27
28
29 O gênero *Alternaria* spp. foi descrito em 1816 por Nees e Friess. Fungos deste
30 gênero são caracterizados por apresentarem colônias branco-acinzentadas com tendência ao
31 preto. São fungos demáceos (fungos com esporos e conídeos de pigmentação escura devido à
32 presença de melanina) de rápido crescimento e microscopicamente encontram-se numerosos
33 conídios lembrando um “bico” geralmente seguido por outro conídio de igual morfologia
34 (SIDRIM e ROCHA, 2004). É um gênero complexo, com centenas de espécies, de

1 distribuição mundial e seus habitats naturais são as plantas. Entretanto, este fungo pode ser
2 responsável por infecções em seres humanos, que podem variar de lesões de pele a infecções
3 disseminadas. As manifestações cutâneas são variáveis e incluem eritema, descamação, lesões
4 verruciformes, eczematosas ou placas ulceradas bem como lesões nodulares e, geralmente,
5 ocorrem nas partes descobertas do corpo. Além destas, onicomicoses e infecções oculares
6 também são associadas a estes fungos. Fungos do gênero *Alternaria* spp. são considerados
7 oportunistas e as infecções causadas por eles têm aumentado nos últimos 20 anos
8 principalmente em indivíduos imunossuprimidos (PEREIRO Jr et al. 2004; DUBOIS et al.,
9 2005; PASTOR e GUARRO, 2008; SEGNER et al., 2009).

10 11 12 1.1.1.2.4 *Curvularia* spp.

13
14
15 *Curvularia* spp. refere-se a fungos demáceos, também de crescimento rápido,
16 descrito por Boedijn em 1933. Macroscopicamente, observam-se colônias aveludadas de
17 coloração variável (verde-escuro, marrom ou preto) recobertas com micélio algodinoso de
18 cor cinza. Microscopicamente, estes fungos apresentam conídios grandes e recurvados com
19 cerca de 3 a 4 septos Estes fungos estão associados as infecções distais nas unhas, as quais
20 podem levar a mudança na coloração das mesmas (ARAÚJO et al., 2003; SIDRIM e
21 ROCHA, 2004; ROMANO et al, 2005).

22 23 24 1.1.1.2.5 *Fonsecaea* spp.

25
26
27 Morfologicamente o gênero *Fonsecaea* é caracterizado pela presença de
28 conidióforos melanizados com denticulos que sustentam conídios isolados ou em cadeias
29 com, no máximo, três conídios cada. O gênero compreende três espécies: *F. pedrosoi*, *F.*
30 *monophora* e *F. nubica* e cada uma tem um potencial patogênico distinto embora os
31 mecanismos de patogenicidade delas permaneçam não esclarecidos. Espécies de *Fonsecaea*
32 são comuns em países de clima tropical e subtropical como, por exemplo, países da América
33 do Sul (DE HOOG et al., 2004; NAJAFZADEH et al.,2011). Fungos deste gênero podem
34 causar uma variedade de infecções (superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistêmicas),

1 entretanto, destaca-se o *F. pedrosoi* que é considerado um dos principais agentes etiológicos
2 da cromoblastomicose (QUEIROZ-TELLES et al., 2009).

3 4 5 **1.1.2 Leveduras**

6 7 8 1.1.2.1 *Trichosporon* spp.

9
10
11 O gênero *Trichosporon* compreende um grupo de leveduras que podem ser
12 encontradas na água, solo e ocasionalmente como um componente da microbiota normal da
13 pele, unhas e mucosas gastrintestinais e respiratórias dos humanos e dos animais (RIBEIRO et
14 al., 2008). É um gênero que conta com 37 espécies sendo caracterizado microscopicamente
15 pela presença de hifas e pseudohifas, blastoconídeos e artroconídeos. Por muitos anos,
16 acreditava-se que existiam poucas espécies de *Trichosporon* e a principal espécie patogênica
17 era o *Trichosporon beigelli* ou também chamado *Trichosporon cutaneum*. Entretanto, um
18 estudo realizado por GUÉHO et al. (1992) baseado em características morfológicas,
19 bioquímicas e moleculares identificou 6 espécies patogênicas e hoje, 7 espécies são
20 associadas a infecções em humanos: *Trichosporon asahii*, *Trichosporon asteroides*,
21 *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon inkin*, *Trichosporon jirovecii*, *Trichosporon mucooides*
22 e *Trichosporon ovoide* (RODRIGUEZ-TUDELA et.al., 2005; MAGALHAES et al., 2008;
23 RIBEIRO et al., 2008).

24 A maioria das espécies de *Trichosporon* pode causar infecções superficiais como:
25 piedra branca, *tinea cruris* e onicomicoses. A piedra branca é a principal infecção associada
26 ao *Trichosporon* e foi relatada em 1865 por Beigel ao isolar o fungo em cabelos de uma
27 peruca. A infecção é caracterizada pelo crescimento do fungo na haste do cabelo, pelos
28 axilares e da região crural, bigode, barba, cílios e sobrancelhas. A infecção é assintomática na
29 maioria das vezes, mas pode deixar os pelos quebradiços. Além das infecções superficiais, o
30 *Trichosporon* também pode causar infecções invasivas denominadas tricosporonose
31 principalmente em indivíduos imunossuprimidos e, por isso, ele é considerado um fungo
32 oportunista (BENTUBO, 2008; KOKSAL et al., 2009).

1 Das espécies de *Trichosporon* associadas a infecções superficiais de pele pode-se
2 destacar *T. asteroides* e *T. cutaneum*. Já *T. inkin* e *T. ovoides* são associados a piedra branca
3 no cabelo e áreas genitais respectivamente (LI et al., 2005).

4 Embora provas bioquímicas e análise morfológica sejam bastante utilizadas na
5 diferenciação de espécies de *Trichosporon* há dificuldades na sua clara identificação.
6 Resultados obtidos por RODRIGUEZ-TUDELA et al. (2005) mostraram que este método de
7 identificação não permitiu identificar as sete espécies associadas a infecções em humanos.
8 Assim, os pesquisadores sugerem que técnicas moleculares são fundamentais para uma
9 identificação rápida e confiável das diferentes espécies de *Trichosporon* (BENTUBO, 2008).

10 11 12 1.1.2.2 *Candida* spp.

13
14
15 Leveduras do gênero *Candida* spp. são colonizadoras da pele e mucosa humana e
16 são consideradas patógenos oportunistas entre indivíduos imunossuprimidos (TAY et al.,
17 2011). São fungos de crescimento rápido cujas colônias apresentam coloração de branca a
18 creme com aspecto que varia de cremosas, lisas, rugosas e sulcadas. Possuem pseudomicélio
19 bem desenvolvido ou rudimentar e algumas espécies apresentam vários micélios verdadeiros e
20 reproduzem-se por brotamento do blastoconídio (KONEMAN et al., 2001).

21 Espécies de *Candida* têm surgido como importantes patógenos ao longo das
22 últimas décadas e apesar de *C. albicans* continuar sendo a principal espécie isolada de
23 infecções no sangue, há uma tendência ao aumento da prevalência de outras espécies de
24 *Candida* associadas com outros tipos de infecções, como por exemplo, *C. parapsilosis*, *C.*
25 *tropicalis*, *C. rugosa*, *C. krusei*, *C. glabrata* (MELO et al., 2011; TAY et al., 2011; GE et al.,
26 2012).

27 Entre as *Candida* não-*albicans* a espécie *C. parapsilosis* atualmente destaca-se
28 como a segunda ou terceira espécie mais comum de levedura encontrada em hemoculturas na
29 América Latina, Canadá, Europa e Ásia. Além disso, esta espécie é a mais frequentemente
30 encontrada em infecções na pele, principalmente no espaço sub ungueal (GE et al., 2012).

31 *Candida* spp. causam infecções nas áreas interdigitais e na pele. Além disso, são
32 importantes agentes causadores de onicomicoses, juntamente com os fungos dermatófitos e
33 estão associadas principalmente com onicomicoses das unhas das mãos. Entretanto,

1 geralmente, não causam infecções nos cabelos (GODOY-MARTINEZ et al., 2009;
2 MANZANO-GAYOSSO et al., 2011).

3 4 5 1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS

6
7
8 Como a maioria dos patógenos, *Candida* spp. e *Trichosporon* spp. desenvolveram
9 estratégias e fatores de virulência para contribuir na colonização, invasão e patogênese. Os
10 fatores de virulência são determinados geneticamente, porém expressos pelos microrganismos
11 quando submetidos a certas condições (TAMURA et al., 2007). Assim, a expressão de fatores
12 de virulência pode variar de acordo com o tipo, local e estágio de infecção bem como da
13 resposta do hospedeiro. Dentre os fatores de virulência de *Candida* spp. e *Trichosporon* spp.
14 estão a produção de proteinase e fosfolipase (chamadas exoenzimas) além da produção de
15 biofilme pelas *Candida* spp. e presença de glucoronoxilomanana por *Trichosporon* spp.
16 (BENTUBO, 2008; MOHANDAS e BALLAL, 2008; TAY et al., 2011). A produção de
17 exoenzimas pode levar à disfunção ou até mesmo à ruptura de membranas celulares, o que
18 facilita a aderência do microrganismo ao hospedeiro a qual é fundamental para a colonização
19 e para o sucesso da infecção (COSTA et al., 2010). Entre as espécies de *Candida*, *C. albicans*
20 é uma grande produtora das exoenzimas e as *C. não-albicans* apresentam menor produção das
21 mesmas (COSTA et al., 2010; TAY et al., 2011).

22 As mais importantes enzimas hidrolíticas secretadas por espécies de *Candida* são
23 as proteinases aspartil secretoras, fosfolipase B e lipases (NAGLIK et al., 2003).

24 As proteinases aspartil secretoras (Sap) constituem uma família composta de
25 várias isoenzimas, onde Sap de 1 a 10 são produzidas e secretadas pelas espécies de *Candida*.
26 As proteinases são capazes de digerir proteínas do hospedeiro contribuindo para a invasão dos
27 tecidos através da degradação de proteínas de matriz extracelular e, além disto, auxilia a
28 *Candida* a driblar a ação do sistema imunológico, através da hidrólise de imunoglobulinas e
29 proteínas do sistema complemento (PORTELA, 2006; MOHANDAS e BALLAL, 2008). As
30 proteinases são produzidas principalmente pelas espécies mais patogênicas de *Candida*, como
31 *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, o que reforça a idéia de que essas enzimas têm
32 relação direta com a virulência (KOMIYAMA et al., 2007). Leveduras do gênero
33 *Trichosporon* spp. também são produtoras de proteinase e BENTUBO (2008) mostrou que
34 quase 46,4% dos isolados de *Trichosporon* analisados apresentavam atividade de proteinase e

1 destas, 23% apresentam atividade fortemente positiva. Contudo, há poucos estudos sobre a
2 atividade desta enzima nestes fungos.

3 A fosfolipase é uma enzima hidrolítica capaz de degradar fosfolipídeos. A
4 presença desta enzima na superfície das *Candida* spp. está associada à lesão na membrana
5 celular pois causa danos nos constituintes lipídicos da membrana celular do hospedeiro. Além
6 disto, a presença de fosfolipase colabora, também, para os processos de aderência e invasão.
7 Nota-se ainda que espécies de *Candida* podem produzir diferentes níveis de atividade de
8 fosfolipase o que está relacionado com o nível de patogenicidade da levedura (MOHANDAS
9 e BALLAL, 2008; COSTA, 2009). *Trichosporon* spp. também produzem esta enzima e
10 BENTUBO (2008) ainda sugere que estes fungos consigam produzir fortemente esta enzima.

11

12

13 1.3 TRATAMENTO DAS DERMATOMICOSSES

14

15

16 Antifúngicos têm ampla aplicação na medicina humana e veterinária e também na
17 agricultura, mas, infelizmente, existe apenas um número escasso destes fármacos em uso e, de
18 forma geral, eles têm eficácia limitada, sendo muitas vezes são tóxicos e de alto custo. De
19 acordo com os mecanismos de ação, os antifúngicos são classificados nas classes: polienos,
20 azóis, alilaminas, morfolinas e equinocandinas. Além dessas classes, temos ainda a
21 griseofulvina. A maioria dos antifúngicos interfere na biossíntese ou na integridade do
22 ergosterol, principal esterol da membrana da célula fúngica. Além de ser o componente
23 predominante da membrana da célula fúngica, o ergosterol serve como um biorregulador da
24 fluidez da membrana e por consequência, da integridade da mesma além de atuar como um
25 sinal para a divisão celular (GHANNOUM e RICE, 1999; GUPTE et al., 2002; RUIZ-
26 HERRERA e SAN-BLAS, 2003; ANDERSON, 2005; CHEN e SORRELL, 2007).

27

28 O tratamento das dermatomicoses consiste na utilização de antifúngicos tópicos
29 ou orais e, quando necessário, o uso combinado de agentes embora em grande parte destas
30 infecções o tratamento seja eficiente apenas com a terapia tópica. Os principais grupos de
31 agentes antifúngicos utilizados no tratamento das dermatomicoses são os das classes dos
32 azóis, morfolinas e alilaminas, além da griseofulvina (GHANNOUM e RICE, 1999;
33 CARRILLO-MUNÓZ et al., 2010; ROTTA et al., 2012).

34

Os azóis são os antifúngicos mais utilizados e atuam inibindo a enzima 14 α -
desmetilase do sistema enzimático citocromo P450 e, como consequência, inibe a síntese do

1 ergosterol, o crescimento e replicação fúngica, ou seja, tem efeito fungistático. Nesta classe há
2 dois grupos de medicamentos: imidazóis representados pelos cetoconazol, miconazol,
3 clotrimazol e econazol e o grupo dos triazóis representados pelos fluconazol, itraconazol,
4 voriconazol e posaconazol. Os azóis diferem em suas afinidades pela 14 α -demetilase e estas
5 diferenças são amplamente responsáveis pela variação em sua potência e seus espectros de
6 atividade. Eles têm ampla aplicação terapêutica e podem ser utilizados tanto na terapia de
7 micoses superficiais quanto no tratamento de infecções invasivas. Além de inibir enzimas
8 fúngicas dependentes do citocromo P450, os azóis inibem também várias enzimas humanas
9 dependentes deste citocromo e isto é responsável pela maioria dos efeitos colaterais clínicos.
10 Os azóis podem ser hepatotóxicos e as reações variam de leve aumento nas transaminases à
11 hepatite crônica (CHEN e SORRELL, 2007; THOMPSON et al., 2009; CARRILLO-
12 MUNÓZ et al., 2010).

13 As alilaminas são representadas especialmente pela terbinafina. Este composto é
14 capaz de provocar uma dupla ação, fungicida e fungistática, e sua atividade é favorecida pelo
15 tecido adiposo e epitelial devido ao caráter lipofílico de suas moléculas (CARRILLO-
16 MUNÓZ et al., 2010). Terbinafina inibe a via da biossíntese do ergosterol através da inibição
17 da esqualeno-2,3-epoxidase. O acúmulo de esqualeno, precursor para esta via, é responsável
18 pelo efeito fungicida, pois extrai lipídios essenciais da membrana fúngica (McGINNIS e
19 PASARELL, 1998). A vida média deste antifúngico nas unhas é prolongada e por isso é uma
20 droga muito importante no tratamento de onicomicoses, apesar da concentração alcançada
21 nessa região ser inferior àquela alcançada na pele e tecido adiposo. Esta ação gera um efeito
22 protetor que dificulta recidivas (CARRILLO-MUNÓZ et al., 2010). É uma droga bem
23 tolerada, mas pode causar desconforto gastrointestinal, alteração no paladar, aumentar
24 transitoriamente as enzimas hepáticas (CHEN e SORRELL, 2007) e levar a dermatite de
25 contato. Terbinafina tem uma elevada atividade frente a fungos dermatófitos, sendo
26 considerada um importante agente no tratamento de dermatofitoses, mas, por sua vez,
27 apresenta baixa atividade frente a leveduras do gênero *Candida* spp. (McGINNIS e
28 PASARELL, 1998; CARRILLO-MUNÓZ et al., 2010).

29 Morfolinas compreendem antifúngicos de amplo espectro com elevada atividade
30 antifúngica para o tratamento de onicomicoses (CARRILLO-MUNÓZ et al., 2010). É
31 indicado contra dermatófitos, leveduras, fungos filamentosos não dermatófitos e fungos
32 dimórficos, demonstrando atividade fungicida para a maioria das espécies. A amorolfina é o
33 representante das morfolinas e tem dois alvos tardios na via de síntese do ergosterol: Erg24p
34 (enzima D14 redutase) e Erg2p (enzima D8-D7 isomerase). Sua ação resulta na depleção de

1 ergosterol e acúmulo de ergosterol na membrana citoplasmática do fungo fazendo com que a
2 parede celular torne-se mais espessa, pois, leva à formação de depósitos de quitina dentro e
3 fora da parede da célula fúngica (ODDS et al., 2003; WELSH et al., 2010). Estudos
4 demonstram a potente atividade antidermatofítica *in vitro* da amorolfina destacando sua
5 capacidade em acumular-se na camada córnea e nas unhas em níveis elevados quando
6 aplicados topicamente (TATSUMI et al., 2002; SCHALLER et al., 2009).

7 Griseofulvina é um antifúngico que inibe o crescimento de várias espécies de
8 dermatófitos. Foi isolado do *Penicillium griseofulvum* e atua interferindo na estrutura e função
9 dos microtúbulos. Além disto, inibe a divisão nuclear dependendo da concentração utilizada.
10 É um fármaco com atividade fungistática que se acumula em células precursoras de queratina
11 onde se fixa e aumenta a resistência desta proteína ao ataque de fungos queratinofílicos.
12 Sendo fungistática, não produz diretamente a morte da célula fúngica deixando a
13 responsabilidade da eliminação total do patógeno para o sistema imunológico do paciente.
14 Este composto não alcança de forma satisfatória as unhas e por isso não é usada no tratamento
15 de onicomicoses. Muitos efeitos secundários são relatados devido ao uso da griseofulvina
16 devido à sua elevada toxicidade (GUPTE et al., 2002; CARRILLO-MUNÓZ et al., 2010).

17 Como as dermatomicoses podem ser causadas por um vasto grupo de fungos, os
18 perfis de suscetibilidade dos mesmos aos antifúngicos disponíveis também variam muito.
19 GHANNOUM et al.(2006) mostraram boa atividade de voriconazol *in vitro* em dermatófitos
20 isolados de *tinea capitis*. O cetoconazol mostrou uma boa atividade contra 200 dermatófitos
21 testados no estudo de FERNÁNDEZ-TORRES et al. (2003) bem como o miconazol. Muitos
22 trabalhos têm confirmado a excelente atividade da terbinafina contra dermatófitos, entretanto,
23 casos de resistência já foram registrados (MUKHERJEE et al., 2003; CETINKAYA et al.,
24 2005; SARIFAKIOGLU et al., 2007; ARAÚJO et al., 2009; BUENO et al., 2009). Infecções
25 por *Fusarium* spp., de forma geral, são tratadas com itraconazol, terbinafina, dentre outros.
26 Entretanto, estudos mostram baixa suscetibilidade *in vitro* dessas espécies frente a
27 antifúngicos (ESPINEL-INGROFF et al., 2001; BUENO et al., 2009). Por isso, este gênero é
28 conhecido por sua resistência a antifúngicos *in vitro* e por sua baixa resposta terapêutica ao
29 fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol (DIGNANI e ANAISSIE, 2004;
30 GUILHERMETTI et al., 2007). Da mesma forma, *Scytalidium* spp. também apresenta baixa
31 sensibilidade aos antifúngicos tradicionalmente utilizadas na terapia (ESCOBAR e
32 CARMONA-FONSECA, 2003) e compostos polienos, como anfotericina B, parecem ser
33 menos ativos *in vitro* que os triazóis e terbinafina no tratamento de infecções por *Fonsecaea*
34 spp. (QUEIROZ-TELLES et al., 2009).

1 Leveduras também apresentam distintas suscetibilidades *in vitro* frente a
2 antifúngicos, de acordo com a espécie. Os dados sugerem que os azólicos apresentam boa
3 atividade contra *Trichoporon*, mas, estes dados ainda são escassos e não há pontos de corte
4 estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standarts Institute* (CLSI) (PAPHITOU et al.,
5 2002; BENTUBO, 2008; RIBEIRO et al., 2008; THOMPSON III et al., 2009). *C. albicans*, *C.*
6 *parapsilosis* e *C. tropicalis* geralmente são susceptíveis aos polienos e azólicos. *C. glabrata* é
7 intrinsecamente menos susceptível ao fluconazol, mas é bastante sensível ao voriconazol e
8 posaconazol. *C. krusei* é intrinsecamente resistente ao fluconazol, entretanto, mostra-se
9 sensível aos azólicos de espectro estendido. Assim, é importante a realização de testes de
10 sensibilidade a fim de se escolher o melhor fármaco a ser utilizado na terapia (NAVARINI,
11 2007).

14 1.4 ENSAIOS DE SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS

17 A determinação da sensibilidade a antifúngicos é relatada como importante fator
18 em prever a habilidade de um antifúngico erradicar o fungo dos tecidos do hospedeiro. Por
19 isso, estes testes revelam-se muito úteis do ponto de vista clínico, pois podem auxiliar na
20 escolha da melhor opção terapêutica (CETINKAYA et al., 2005; ATAÍDES et al., 2011). A
21 experiência com antibacterianos indica melhores resultados para terapias guiadas pelos
22 resultados de testes de suscetibilidade *in vitro* em relação às terapias baseadas meramente na
23 identificação do agente etiológico. E isso ressalta, mais uma vez, a importância da realização
24 dos ensaios de suscetibilidade *in vitro* tanto para identificar organismos resistentes quanto
25 para otimizar a seleção da terapia antimicrobiana (GROLL e KOLVE, 2004).

26 O CLSI publicou recentemente métodos de referência para testes de
27 suscetibilidade *in vitro* para leveduras (documentos M27-A3, M27-S3, M44-A2, M44-S3) e
28 fungos filamentosos (M38-A2, M51-A, M51-S1) (KANAFANI e PERFECT, 2008; CLSI,
29 2012) tanto por métodos de diluição em ágar quanto diluição em caldo para determinar a
30 concentração inibitória mínima (CIM). Estes protocolos têm permitido criar padrões de
31 comparação de dados clínicos, analisar o surgimento de resistência *in vitro* e acompanhar
32 casos clínicos que não respondem ao tratamento (CETINKAYA et al., 2005).

33 Os documentos preconizados pelo CLSI têm tentado estabelecer pontos de corte
34 para determinar a sensibilidade dos fungos aos antifúngicos, buscando estabelecer a relação

1 entre a resposta clínica e resposta *in vitro*. Entretanto, ainda é um desafio interpretar os
2 resultados dos testes de suscetibilidade *in vitro*, pois, estes nem sempre estão associados
3 diretamente com a resposta para a terapia antifúngica (ANDERSON, 2005; KANAFANI e
4 PERFECT, 2008). Uma explicação para tal problema é que a doença é o resultado de
5 complexas interações entre os patógenos e os hospedeiros, por isso, o fracasso em controlar
6 infecções por fungos patogênicos classificados como sensíveis aos antifúngicos pela CIM e o
7 sucesso em controlar infecções por fungos classificados como resistentes de acordo com a
8 CIM não são surpresas. Além disso, é necessário levar em consideração o fato de que os
9 fungos, assim como outros organismos, têm a capacidade de sofrer mudanças devido às fortes
10 interações ambientais e genótípicas (ANDERSON, 2005). Cabe ressaltar ainda que, para
11 certos fungos, como os dermatófitos, a correlação de suscetibilidade a antifúngicos *in vitro*
12 com a atividade *in vivo* permanece difícil de estabelecer e isto está parcialmente relacionado a
13 problemas metodológicos associados à seleção de condições ótimas para o ensaio *in vitro*
14 (GROLL e KOLVE, 2004). Por estas razões, contínuos esforços são necessários para realizar
15 pesquisas experimentais e clínicas com substâncias antifúngicas visando esclarecer as
16 relações das respostas *in vitro* e *in vivo* bem como estabelecer padrões metodológicos ótimos
17 para a realização destes testes.

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

2 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas observou-se o aumento das infecções fúngicas em todo o mundo e, dentre estas infecções, as dermatomicoses são consideradas uma das doenças dermatológicas mais comuns nos habitantes dos países tropicais (HAVLICKOVA et al., 2008; SIMONNET et al., 2011). Estas micoses afetam a qualidade de vida dos indivíduos acometidos causando desconforto e constrangimentos, bem como dificultando a realização de atividades diárias. A prevalência de fungos associados a estas infecções varia dependendo de diferenças regionais. Além disso, populações de países tropicais em desenvolvimento estão mais propensas a sofrer com estas doenças, tanto pelo clima que favorece o crescimento fúngico quanto pelas condições higiênico-sanitárias (CHARLES, 2009). Apesar das dermatomicoses afetarem cerca de 20 a 25% da população mundial, poucos estudos têm investigado a etiologia dessas doenças e a escassez de dados dificulta o conhecimento de quaisquer alterações em sua epidemiologia (AMEEN, 2010). A terapia das micoses dermatológicas baseia-se na utilização de compostos tópicos e orais que, se necessário, podem ser usados em combinação. Entretanto, estes agentes apresentam eficácia limitada, geralmente são tóxicos, de alto custo e grande parte deles tem o mesmo mecanismo de ação. Além disto, os distintos grupos de fungos causadores de dermatomicoses, e até mesmo as diferentes espécies de um mesmo grupo, respondem de forma diferente aos antifúngicos, e o desenvolvimento de resistência tem sido relatado (GHANNOUM e RICE, 1999; GUPTE et al., 2002; CHEN e SORRELL, 2007; MARTINEZ-ROSSI et al., 2008). Vale ressaltar, ainda, que leveduras assim como outros microrganismos podem expressar fatores de virulência, os quais contribuem para a instalação de todo o processo infeccioso (TAMURA et al., 2007). Estes fatores, somados, justificam a falha terapêutica e mostram a necessidade de realizar tanto a identificação dos fungos quanto a realização de testes de suscetibilidade a antifúngicos. Estes procedimentos poderiam contribuir com o clínico na escolha do melhor antifúngico para o tratamento dos pacientes, acompanhar casos de falha terapêutica e analisar o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos (BUENO et al., 2009; KOKSAL et al., 2009; ATAÍDES et al., 2011).

1 **3 OBJETIVOS**

2

3

4 **3.1 OBJETIVO GERAL**

5

6

7 Identificar e determinar o perfil de suscetibilidade a antifúngicos de leveduras e
8 fungos filamentosos isolados de dermatomicoses na cidade de Uberaba-MG, e avaliar a
9 produção de proteinases e fosfolipases pelas leveduras.

10

11

12 **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

13

14

15 - Identificar os fungos isolados de pacientes com dermatomicoses por meio de
16 métodos clássicos;

17 - Determinar a distribuição dos fungos isolados de dermatomicoses de acordo com
18 a idade do paciente, sexo e sítio de infecção;

19 - Definir o perfil de suscetibilidade desses fungos frente aos antifúngicos:
20 cetoconazol, fluconazol, griseofulvina, itraconazol, terbinafina e voriconazol;

21 - Avaliar a capacidade de produção de fosfolipases e proteinases pelas leveduras
22 isoladas.

23

24

25

26

27

28

29

30

31

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAS CLÍNICAS

As amostras clínicas foram obtidas a partir de raspados de unha, pele e pelos de pacientes com suspeita clínica de dermatomicoses encaminhados sob orientação médica ao serviço de patologia clínica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) ou para laboratório particular de Uberaba - MG, após aprovação do protocolo de pesquisa nº 1361 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM, durante o período de Julho de 2009 a Julho de 2011 (Anexo A).

As amostras foram cultivadas e após o crescimento das colônias e pré-identificação dos fungos, as culturas foram encaminhadas para o Laboratório da disciplina de microbiologia da UFTM. Além das culturas, dados dos pacientes como sexo, idade, sítio de coleta e uso ou não de antifúngicos também foram fornecidos. Apenas uma amostra por paciente foi analisada e só foram inseridas neste trabalho as amostras que foram positivas no exame direto e na cultura.

As amostras de fungos filamentosos e leveduras foram armazenadas em caldo infusão de cérebro e coração (Himedia Laboratories, Mumbai, India) com 30% de glicerol (SILVA et al., 2008) mantidas à -20°C. Fungos filamentosos foram armazenados em tubos de vidro com solução salina estéril à 4°C. Foram realizados dois subcultivos de cada amostra antes que a mesma fosse processada.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS:

Embora os fungos tenham sido enviados ao Laboratório da disciplina de microbiologia previamente identificados, todas as identificações foram confirmadas e as *Candida* spp. e dermatófitos que apresentavam apenas identificação do gênero foram identificados ao nível de espécie.

4.2.1 Leveduras

As amostras foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (ASD; Himedia Laboratories, Mumbai, India) com Cloranfenicol (Ariston, New Jersey, EUA), incubadas em estufa a temperatura de $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 48 horas. A identificação das leveduras foi feita por meio de testes bioquímicos (urease, auxanograma e zimograma), morfologia microscópica, produção de tubo germinativo e crescimento em meio de cultura cromogênico.

4.2.1.1 Teste da urease

Leveduras foram inoculadas em meio de cultivo em ágar uréia de CHRISTENSEN (Difco laboratories, Detroit, USA) e incubadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 24-48 horas. A positividade foi avaliada por meio da produção de amônia a partir da uréia, pela ação da urease, que alcaliniza o meio e muda a cor do indicador de pH, vermelho de fenol, do amarelo para o róseo intenso (CHRISTENSEN, 1946).

4.2.1.2 Assimilação de carbono e nitrogênio (Auxanograma)

O teste de assimilação de carbono foi realizado de acordo com a metodologia de LODDER e KREGER-VAN-RIJ, 1952. O meio teste foi preparado com 5 g de sulfato de amônio, 1 g de fosfato de potássio, 0,5 g de sulfato de magnésio $7\text{H}_2\text{O}$, 20 g de ágar base e 1000 mL de água destilada. A partir do cultivo de leveduras em ASD (Himedia Laboratories, Mumbai, India), foi preparada uma suspensão de levedura e água destilada. A turbidez foi então ajustada de acordo com a escala cinco de McFarland e 2 mL desta suspensão foi colocada em placa de Petri (150 x 15 mm) contendo 40 mL do meio teste. Após homogeneização manual e solidificação do meio, foram adicionados sobre o meio cerca de 50 μg de cada um dos seguintes carboidratos: dextrose, galactose, lactose, maltose, sacarose, melibiose, celobiose, trealose, rafinose, inositol, ramnose, xilose, inulina e manitol (Inlab, São Paulo, Brasil), os quais foram colocados em pontos equidistantes, com auxílio de

1 espátulas de madeira estéreis. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$
2 com a face que continha os açúcares voltada para cima nas primeiras 24 horas e invertida nas
3 24 horas seguintes. A leitura do teste foi visual considerando-se positivo quando havia
4 formação de halo de crescimento na presença do carboidrato.

5 O teste de assimilação de compostos nitrogenados foi realizado em placas de Petri
6 (90 x 15 mm) contendo 20 mL do meio teste o qual foi preparado com 20 g de dextrose, 1 g
7 de fosfato de potássio monobásico, 0,5 g de sulfato de magnésio $7\text{H}_2\text{O}$, 20 g de ágar base e
8 1000 mL de água destilada. Em cada placa foram colocados 1 mL de suspensão de levedura,
9 preparada como descrito anteriormente. Após homogeneização e solidificação do meio, foram
10 colocados, em pontos equidistantes, cerca de 50 μg de peptona como controle positivo e 50
11 μg de KNO_3 como fonte de nitrogênio. As placas foram incubadas em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ por
12 48h. As amostras positivas apresentaram halo de crescimento em presença do substrato
13 (LODDER e KREGER-VAN-RIJ, 1952; KURTZMAN e FEL, 1998).

14 15 16 4.2.1.3 Fermentação de carboidratos (Zimograma)

17
18
19 Uma suspensão de leveduras foi preparada em água destilada estéril e ajustada a
20 turbidez de acordo com escala cinco de McFarland. Foram inoculados 200 μL desta
21 suspensão em tubo de rosca (125 X 10 mm) contendo 4 ml do meio de fermentação (4,5 g de
22 extrato de leveduras, 7,5 g de peptona e 1000 mL de água destilada) e tubo de Durham
23 invertido. Cada tubo ainda continha um dos seguintes açúcares: dextrose, sacarose, lactose,
24 galactose, maltose e trealose (Inlab, São Paulo, Brasil) a 2%. Após a inoculação da suspensão
25 de leveduras, os tubos foram incubados a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ e a leitura foi realizada após 24-48 horas e,
26 subsequentemente, a cada cinco dias, até o vigésimo dia. A presença de gás no interior do
27 tubo de Durham indicava a capacidade de fermentação do microrganismo (WICKERHAM,
28 1951).

29
30
31
32
33

1 4.2.1.4 Análise em meio de cultura cromogênico

2
3
4 Para avaliar a pureza das amostras bem como contribuir para a diferenciação de
5 espécies de *Candida* e outras leveduras foi realizado o cultivo em CHROMagar *Candida*®
6 (Difco laboratories, Detroit, USA) por 48h a 36°C ± 1 protegidos da luz. Este meio que
7 permite a identificação presuntiva de *Candida* spp. tem como fundamento a alteração da cor
8 da colônia através de indicadores de pH e fermentação de substâncias específicas do meio ou
9 substratos cromógenos (PFALLER et al.,1996). É capaz de diferenciar as espécies pela cor e
10 morfologia das colônias e baseia-se na utilização de um substrato chamado β-glicosaminidase
11 (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2001; COOKE et al., 2002).

14 4.2.1.5 Prova de tubo germinativo

15
16
17 Este teste simples permite a identificação presuntiva e rápida de *Candida*
18 *albicans*. Leveduras foram cultivadas por 24 horas à 36°C e em seguida, uma alçada da
19 mesma foi suspensa em tubo de ensaio estéril contendo 0,5 mL de soro humano. O tubo de
20 ensaio foi incubado à 37°C por 3 horas e depois, uma gota da suspensão foi colocada entre
21 lâmina e lamínula e a formação de tubo germinativo foi observada em microscópio.
22 Considerou-se o teste positivo quando observou-se a presença de filamentos cilíndricos
23 originados do blastoconídeo sem qualquer zona de constrição.

26 4.2.1.6 Microcultivo em lâmina

27
28
29 A formação de diferentes estruturas celulares foi observada pela técnica de
30 DALMAU (1929) que permite o estudo micromorfológico das leveduras. Placas de Petri
31 foram preparadas com lâmina apoiada em um suporte, lamínula e algodão, os quais foram
32 esterilizados. Sobre a lâmina foi colocado meio ágar fubá (ágar *cornmeal*, Himedia
33 Laboratories, Mumbai, India) acrescido de Tween 80 e leveduras foram semeadas em 3 estrias
34 paralelas sobre a superfície do meio. As estrias foram cobertas com lamínulas (24 mm x 24

1 mm) estéreis e, em seguida, as placas de Petri foram incubadas à temperatura de $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ por
2 48-96 horas com algodão embebido de água estéril, para formar uma câmara úmida. Após o
3 período de incubação, foram realizadas análises das estruturas reprodutivas dos fungos
4 (Figura 1A).

7 **4.2.2 Fungos Filamentosos**

10 As amostras foram semeadas em ASD (Himedia Laboratories, Mumbai, India)
11 com Cloranfenicol (Ariston, New Jersey, EUA) e em meio seletivo ágar Mycosel (Himedia
12 Laboratories, Mumbai, India), incubadas em estufa à 28°C por até 4 semanas. A identificação
13 dos fungos filamentosos foi feita por meio da análise dos aspectos macroscópicos das
14 colônias (consistência, tempo de desenvolvimento, pigmentação do verso e reverso), aspectos
15 microscópicos por meio de microcultivo em ágar batata, teste de uréia e cultura em ágar
16 *Trichophyton* para identificar espécies de *Trichophyton* spp.

19 **4.2.2.1 Microcultivo em lâmina**

22 O microcultivo em lâmina foi realizado para permitir a visualização dos arranjos
23 das estruturas dos fungos filamentosos. Placas de Petri foram preparadas com lâmina apoiada
24 em um suporte, lamínula e algodão, os quais foram esterilizados. Fragmentos circulares de
25 ágar batata dextrose (ABD, Himedia Laboratories, Mumbai, India) foram colocados sobre a
26 lâmina e os fungos foram inoculados em 4 pontos do ABD (Himedia Laboratories, Mumbai,
27 India). O meio foi coberto com lamínula (24 x 24 mm) estéril, o algodão foi embebido de
28 água estéril e as placas foram incubadas à 28°C até o crescimento visual evidente do fungo
29 sob a lamínula. Após o crescimento dos fungos, a lamínula foi removida e colocada sobre
30 uma lâmina com uma gota de corante Lactofenol Azul de Algodão e as estruturas fúngicas
31 foram analisadas em microscópio em objetiva de 40 X (LACAZ et al., 2002; SIDRIM e
32 ROCHA, 2004) (Figura 1B).

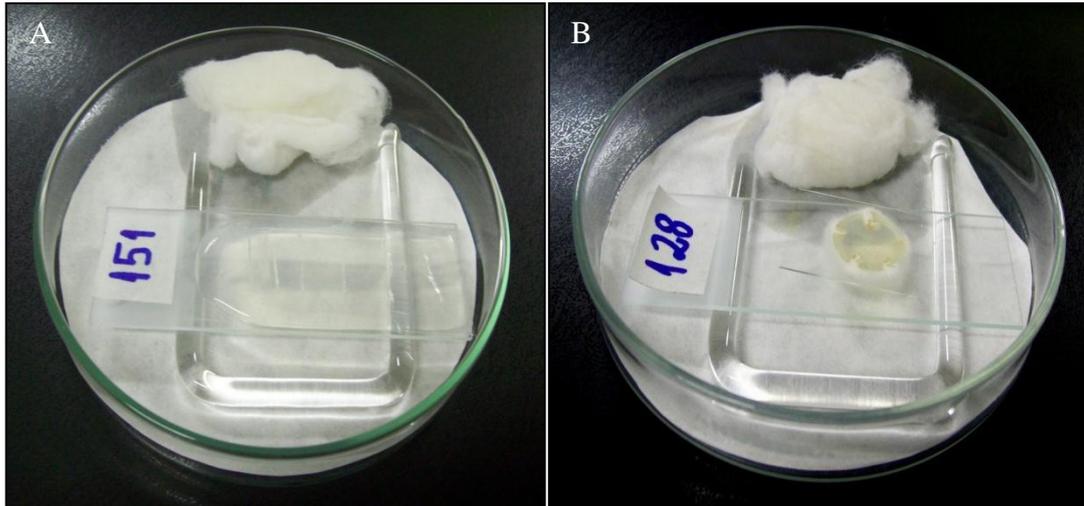


Figura 1: Microcultivo de levedura em ágar fubá (A) e de fungo filamentosos em ágar batata dextrose (B)

4.2.2.2 Teste da urease

A capacidade de hidrolisar uréia fornece dados adicionais para ajudar a distinguir, principalmente, *T. rubrum* de *T. interdigitale*, pois, o teste é positivo para o segundo e negativo para o primeiro (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995). Em geral, *T. interdigitale* hidrolisa a uréia muito antes (<7 dias) que o *T. rubrum* (>7 dias) (ATES et al., 2008). Fungos foram inoculados em meio ágar uréia de CHRISTENSEN (Difco laboratories, Detroit, USA) e incubados a 28°C durante 7 dias. A positividade foi avaliada por meio da produção de amônia a partir da uréia, pela ação da urease, que alcaliniza o meio e muda a cor do indicador de pH, vermelho de fenol, do amarelo para o róseo intenso (CHRISTENSEN, 1946).

4.2.2.3 Ágar *Trichophyton*

Espécies do gênero *Trichophyton* spp. apresentam necessidades nutricionais diferentes e isto contribui para a identificação, principalmente, dessas diferentes espécies. GEORG E CAMP (1957) desenvolveram meios de cultura para a diferenciação de *Trichophyton* spp. baseados na exigência específica de vitaminas e aminoácidos (tiamina, histidina, inositol e ácido nicotínico). São sete meios utilizados para estas provas nutricionais

1 (T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7) os quais foram preparados segundo indicações do fabricante
2 (Himedia Laboratories, Mumbai, India). Foi feita uma suspensão de fungo em solução salina
3 de acordo com a escala dois de McFarland e esta solução foi semeada em todos os sete meios
4 que foram incubados à 28°C por 15 dias. A leitura dos testes foi feita por comparação na qual
5 avaliou-se o crescimento dos fungos classificando-o como: ausência de crescimento (0),
6 pouco crescimento (+), muito crescimento (++) (SIDRIM e ROCHA, 2004).

9 4.3 TESTES DE SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS

12 Todos os testes foram feitos pelo método de microdiluição em caldo, de acordo
13 com os protocolos do CLSI, a partir dos quais determinou-se a concentração inibitória mínima
14 (CIM) dos antifúngicos.

17 **4.3.1 Preparo dos agentes antifúngicos**

20 Foram testados cinco antifúngicos para leveduras: cetoconazol, fluconazol
21 (Pfizer®, Guarulhos, Brazil), itraconazol (Janssen S.A, Madrid, Spain), voriconazol (Pfizer®,
22 São Paulo, Brazil) e terbinafina (Novartis Research Institute, Vienna, Austria). Para fungos
23 filamentosos, além dos antifúngicos acima, foi testado também griseofulvina (Schering-
24 Plough, New Jersey, EUA). Soluções estoques foram preparadas em água (fluconazol) ou
25 dimetilsulfóxido (DMSO) (itraconazol, terbinafina, cetoconazol, griseogulvina e voriconazol).
26 Diluições finais dos antifúngicos foram feitas em meio RPMI 1640 (Himedia Laboratories,
27 Mubai, India), ajustado em pH 7,0 com ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS; Sigma-
28 Aldrich, Sto Luis, EUA). Alíquotas de cada antifúngico foram preparadas e depois
29 distribuídas em placas de microdiluição por diluição seriada. Cetoconazol, itraconazol,
30 voriconazol e terbinafina foram testados nas concentrações de 0,0313 a 16,0 µg/mL e
31 fluconazol e griseofulvina testados nas concentrações de 0,125 a 64,0 µg/mL.

4.3.2 Leveduras

Os testes foram realizados de acordo com o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008). Cepas recomendadas pelo CLSI de *C. parapsilosis* ATCC® 22019 e *C. krusei* ATCC® 6258 foram utilizadas para o controle de qualidade dos testes.

4.3.2.1 Preparo do inóculo

As amostras utilizadas foram previamente cultivadas em ASD (Himedia laboratories, Mumbai, India) à temperatura de $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 24 horas. Colônias foram suspensas em salina estéril (0,85%) e a suspensão foi ajustada para uma concentração de 1×10^6 a 5×10^6 UFC/mL por contagem em câmara de Neubauer (Neubauer Improved Chamber) e análise em espectrofotômetro (BEL Photonics 1105, Monza, Itália) no comprimento de onda de 530nm para transmitância de 85%. O inóculo foi diluído 1:50 em salina estéril e em seguida, diluído novamente 1: 20 em meio RPMI resultando em uma suspensão de leveduras contendo 1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL. Desta suspensão, 100 μL foram adicionados em cada poço da placa de microtitulação contendo 100 μl dos antifúngicos resultando em uma concentração final de 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ células por mL. As placas foram incubadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 48 horas.

4.3.2.2 Interpretação dos resultados

A CIM foi determinada visualmente como a menor concentração de antifúngico capaz de inibir 50% (azóis) ou 100% (terbinafina) do crescimento em relação ao controle positivo (CLSI, 2008). Os pontos de corte dos antifúngicos itraconazol, voriconazol e fluconazol foram analisados de acordo com o CLSI, documento M27-A3 de 2008 (Tabela 2).

1 **Tabela 2:** Pontos de corte em µg/ml para *Candida* spp. contra os agentes antifúngicos segundo o protocolo do
 2 CLSI, M27-A3.

Antifúngico	Susceptível	Suscetibilidade dose-dependente	Intermediário	Resistente
Fluconazol	≤ 8	16-32	–	≥64
Itraconazol	≤ 0,125	0,25-0,5	–	≥ 1
Voriconazol	≤ 1	2	–	≥ 4
Cetoconazol	< 2	–	–	≥ 2

3 Fonte: Modificado de CLSI M27-A3, 2008.

6 4.3.3 Fungos Filamentosos

7
 8
 9 Foram realizados testes de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo
 10 M38–A2 (CLSI, 2008) para fungos filamentosos, com modificações (SANTOS e HAMDAN,
 11 2005). Cepas *T. rubrum* ATCC® MYA 4438 e *T. interdigitale* ATCC® MYA 4439 foram
 12 utilizadas como controle de qualidade dos testes.

15 4.3.3.1 Preparo do inóculo

16
 17
 18 As amostras foram cultivadas em ágar batata dextrose (ABD; Himedia
 19 Laboratories, Mumbai, India) a 28°C por 7 dias para fungos dermatófitos e 3 dias para FFND.
 20 Após o período de incubação as colônias foram cobertas com 5 ml de salina estéril (0,85%) e
 21 a superfície das colônias foi raspada com a ponta de uma pipeta Pasteur de vidro. Em seguida,
 22 a suspensão de conídios e de fragmentos de hifas foi filtrada em gaze estéril e a densidade da
 23 suspensão resultante foi ajustada em espectrofotômetro (BEL Photonics 1105, Monza, Itália),
 24 ao comprimento de onda de 520 nm para uma transmitância de 70 a 72%, levando à obtenção
 25 de um inóculo contendo de 2×10^6 a 4×10^6 UFC/mL. O ajuste do inóculo foi confirmado
 26 pelo plaqueamento de 0,01 mL da suspensão em ABD e posterior contagem das colônias após
 27 a incubação a 28°C, até que as mesmas tornassem visíveis. A suspensão do inóculo foi diluída
 28 1:50 em meio RPMI obtendo-se de 4×10^4 a 8×10^4 UFC/mL e, desta suspensão, 100µL
 29 foram adicionados em cada poço da placa de microtitulação contendo 100µl dos antifúngicos
 30 resultando em suspensão de 2×10^4 a 4×10^4 células por mL. As placas foram incubadas à

1 28°C por 7 dias para fungos dermatófitos e 4 dias para FFND. Para cada ensaio, dois
2 antifúngicos, escolhidos aleatoriamente, foram testados em duplicata.

3

4

5 4.3.3.2 Interpretação dos resultados

6

7

8 As leituras foram realizadas visualmente baseadas na comparação do crescimento
9 nos poços contendo os antifúngicos com os poços do controle positivo de crescimento. Para
10 ao azóis, a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento
11 e para griseofulvina e terbinafina a CIM foi definida como a menor concentração que inibiu
12 100% do crescimento fúngico (Figura 2).

13

14



15

16 **Figura 2:** Teste de microdiluição em caldo de fungo dermatófito. Dos antifúngicos testados, dois foram
17 selecionados aleatoriamente e testados em duplicata. C+ = Controle positivo, C - = Controle negativo

18

19

20

21

22

23

24

25

4.4 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS

4.4.1 Proteinase

A produção de proteinase foi avaliada de acordo com AOKI et al. (1990) e ABACI (2011). O meio teste consistiu em ágar contendo soro albumina bovina (SAB). Uma solução contendo 0,16g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,0g K_2HPO_4 , 4g NaCl, 0,8g de extrato de levedura, ágar base 2%, 16g de glicose e 2,0g de SAB foi preparada para volume final de 800ml e o pH ajustado para 3,5 com HCl a 1 N.

A suspensão da amostra a ser testada foi ajustada por contagem em câmara hematocitométrica de Neubauer (Neubauer Improved Chamber) a uma concentração de 1×10^7 UFC/ml e o inóculo consistiu em 5µl dessa suspensão. Cada isolado foi testado em duplicata. As placas foram incubadas a 36°C por 7 dias. Os halos de precipitação foram mensurados e a atividade de proteinase foi expressa como valores de Pz (zona de precipitação) que é a razão entre o diâmetro da colônia (DC) e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação formada (DP) (Figura 3A). De acordo com os valores de Pz encontrados, as amostras foram classificadas em quatro grupos segundo Noumi et al (2010): Pz entre 0,9 e 1 (+), valores de Pz muito altos (atividade muito baixa); 0,89-0,80 (++) , valores de Pz altos (atividade baixa); 0,79-0,7 (+++), valores baixos de Pz (atividade alta) e Pz <0,69 (++++) valores muito baixos de Pz (atividade muito alta).

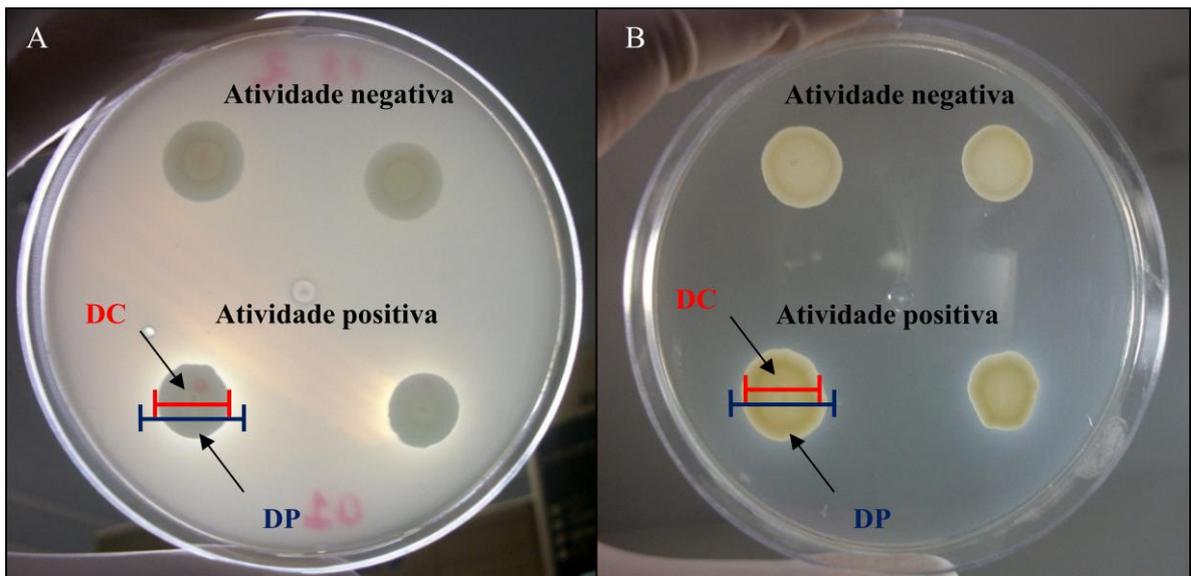
4.4.2 Fosfolipase

A produção de fosfolipase foi avaliada de acordo com PRICE et al. (1982) e ABACI (2011). O meio teste consistiu em ASD (Himedia laboratories, Mumbia, India), NaCl 1mol/L, $CaCl_2$ 0,005mol/L e 8% de *Egg Yolk Emulsion* (Sigma-Aldrich, Sto Luis, EUA). Foi feita uma suspensão da levedura em solução salina a qual foi ajustada por contagem em câmara de Neubauer (Neubauer Improved Chamber) a uma concentração de 1×10^7 UFC/ml. Desta suspensão, foram pipetados 5µl na placa com o meio teste. As placas foram incubadas a 36°C por 5 dias e os halos de precipitação foram mensurados e a atividade da fosfolipase foi

1 medida de acordo como descrito anteriormente para a proteinase (Figura 3B). Cada teste foi
2 realizado em duplicata. A partir dos resultados, as amostras foram divididas em classes de
3 acordo com ABACI (2011), no qual Pz igual a 1, a atividade enzimática foi classificada como
4 negativa; $Pz > 0,63$, a atividade foi considerada positiva e $Pz < 0,63$, classificada como
5 atividade muito alta.

6

7



8

9 **Figura 3:** Avaliação da produção de exoenzimas. Proteinase (A) e fosfolipase (B) onde $PZ=DC/DP$.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DERMATOMICOSSES

Durante o período de estudo foram analisadas 216 amostras, das quais 131 (60,6%) eram de indivíduos do sexo feminino e 85 (39,4%) do sexo masculino.

Nenhum dos pacientes fazia uso prévio de drogas antifúngicas e a faixa etária dos indivíduos variou de 3 a 92 anos, com média de 43,17; mediana de 41 e desvio padrão (DP) de $\pm 18,49$ anos. Destes, 13 (6%) eram crianças e jovens entre 0 e 15 anos, 46 (21,3%) eram jovens e adultos de 16 a 30 anos, 114 (52,8%) eram adultos entre 31 e 60 anos e 43 (19,9%) eram indivíduos com idade superior a 60 anos. As caracterizações dos pacientes segundo o gênero e a faixa etária estão na Tabela 3.

Tabela 3: Caracterização dos pacientes com dermatomicoses segundo a faixa etária e o sexo.

Faixa etária	Gênero		Total
	Feminino n (%)	Masculino n (%)	
0 - 15 anos	6 (2,8)	7 (3,2)	13 (6,0)
16 - 30 anos	31 (14,4)	15 (6,9)	46 (21,3)
31 - 60 anos	68 (31,5)	46 (21,3)	114 (52,8)
> 60 anos	26 (12,0)	17 (7,9)	43 (19,9)
Total	131 (60,7)	85 (39,4)	216 (100)

Das amostras analisadas, 93 (43,1%) foram obtidas de raspados ungueais dos quais, 22 (10,2%) eram das unhas das mãos e 71 (32,9%) eram das unhas dos pés. Foram obtidas, ainda, 15 (6,9%) amostras de raspado palmar, 48 (22,2%) amostras de raspado plantar, 7 (3,2%) do couro cabeludo, 5 (2,3%) da face e 48 (22,2%) de outros locais do corpo (tronco, braços e pernas). A análise da idade e local de infecção está demonstrada na tabela 4. Infecção nas unhas dos pés foi a mais comum entre adultos de 31 a 60 anos bem como entre os indivíduos maiores de 60 anos. Apenas adultos com idade entre 31 e 60 anos apresentaram lesão na face. No grupo de 0 a 15 anos, o local mais acometido foram os pés seguido de lesão no couro cabeludo.

1 **Tabela 4:** Distribuição das dermatomicoses de acordo com sua localização e idade dos pacientes.

Local de infecção	Distribuição de idade				Total
	0 - 15 anos	16 - 30 anos	31 - 60 anos	> 60 anos	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Mãos	1 (0,5)	2 (0,9)	10 (4,6)	2 (0,9)	15 (6,9)
Pés	6 (2,8)	15 (6,9)	18 (8,3)	9 (4,2)	48 (22,2)
Unhas das mãos	—	4 (1,9)	8 (3,7)	10 (4,6)	22 (10,2)
Unhas dos pés	1 (0,5)	13 (6,0)	44 (20,4)	13 (6,0)	71 (32,9)
Corpo	2 (0,9)	11 (5,1)	26 (12,0)	9 (4,2)	48 (22,2)
Face	—	—	5 (2,3)	—	5 (2,3)
Couro cabeludo	3 (1,4)	1 (0,5)	3 (1,4)	—	7 (3,2)
Total	13 (6,0)	46 (21,3)	114 (52,8)	43 (19,9)	216 (100)

2

3

4

5

6

7

8

9

10

Tabela 5: Distribuição das dermatomicoses segundo o local de infecção e o sexo.

Local de infecção	Gênero		Total
	Feminino	Masculino	
	n (%)	n (%)	
Mãos	8 (3,7)	7 (3,2)	15 (6,9)
Pés	32 (14,8)	16 (7,4)	48 (22,2)
Unhas das mãos	14 (6,5)	8 (3,7)	22 (10,2)
Unhas dos pés	51 (23,6)	20 (9,3)	71 (32,9)
Corpo	20 (9,2)	28 (13,0)	48 (22,2)
Face	3 (1,4)	2 (0,9)	5 (2,3)
Couro cabeludo	3 (1,4)	4 (1,9)	7 (3,2)
Total	131 (60,7)	85 (39,4)	216 (100)

11

12

13

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

14

15

16

17

18

Das 216 amostras, 116 (53,7%) eram leveduras e 100 (46,3%) eram fungos filamentosos e não foi verificada a ocorrência de infecção mista em nenhuma das amostras analisadas.

5.2.1 Leveduras

As 116 leveduras foram identificadas por meio da análise das características macro e microscópicas bem como pelas provas bioquímicas (urease, auxanograma e zimograma), produção de tubo germinativo e crescimento em meio cromogênico.

Macroscopicamente, as colônias das 116 leveduras isoladas apresentavam-se cremosas com variação na textura, como mostrado na Figura 4 A e B.

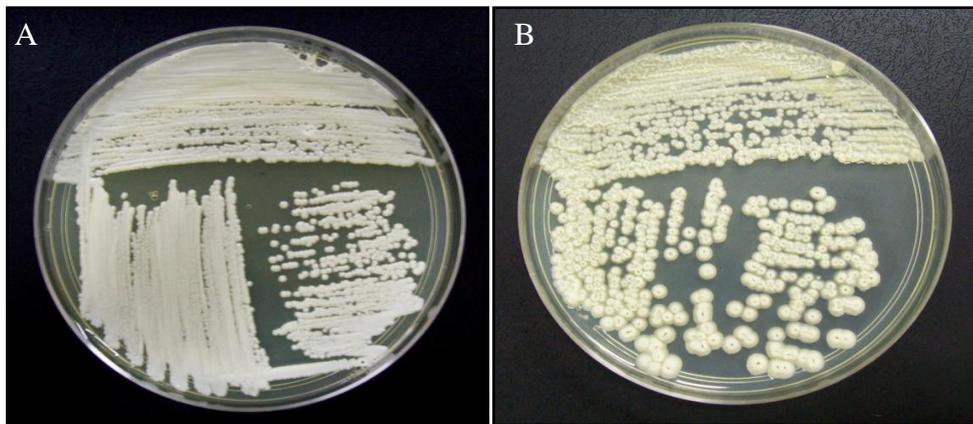


Figura 4: Aspecto macroscópico de leveduras isoladas de pacientes cultivadas em ágar Sabouraud dextrose. Colônias brilhantes de *Candida* spp. de consistência cremosa e coloração creme (A) e colônias de *Trichosporon* spp. com aspecto seco, superfície rugosa e coloração clara (B).

Microscopicamente, foram visualizadas as estruturas fúngicas características das diferentes espécies de *Candida* spp. e do gênero *Trichosporon* spp. como pseudo-hifas e artroconídeos (Figura 5A e B).

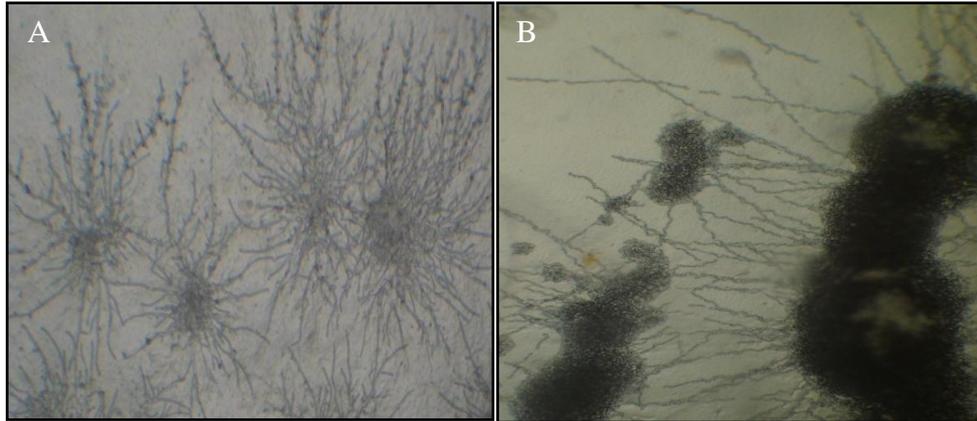


Figura 5: Análise microscópica das estruturas de leveduras visualizadas em objetiva de 40X após cultivo em ágar fubá. *C. parapsilosis* mostrando pseudohifas espalhadas em todas as direções, em forma de aranha (A) e *Trichosporon* spp. apresentando artroconídeos retangulares e pseudohifas (B).

Provas bioquímicas (urease, auxanograma e zimograma), produção de tubo germinativo e crescimento em meio cromogênico contribuíram para a identificação das espécies de *Candida* spp. A figura abaixo mostra os resultados de alguns destes testes.

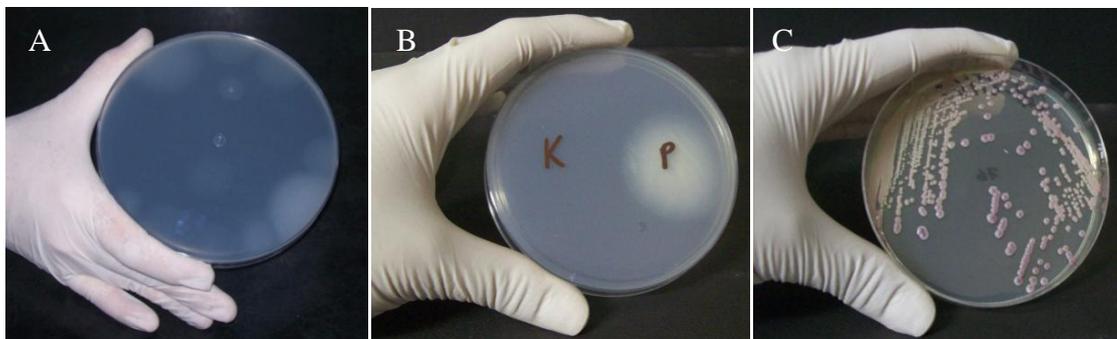


Figura 6: Identificação de *Candida parapsilosis*. Assimilação de carboidratos mostrando halos de crescimento na área correspondente à cada fonte de carboidrato que a levedura foi capaz de assimilar (A). Assimilação de nitrogênio mostrando halo de crescimento na presença do controle positivo, peptona (P) e ausência de crescimento na presença de nitrato de potássio (K) (B). A cultura em CHROMagar *Candida*® revelando colônias lisas de coloração rósea compatíveis com *C. parapsilosis* (C).

Das 116 leveduras isoladas, 104 (89,65%) foram identificadas como pertencentes ao gênero *Candida* spp. e 12 (10,35%) como pertencentes ao gênero *Trichosporon* spp. Dentre as espécies de *Candida*, *C. parapsilosis* (n= 52) foi a espécie mais encontrada seguida de *C. guilliermondii* (n= 24), *C. tropicalis* (n= 17), *C. albicans* (n= 9), *C. krusei* (n= 1) e *C. rugosa* (n= 1) (Figura 7).

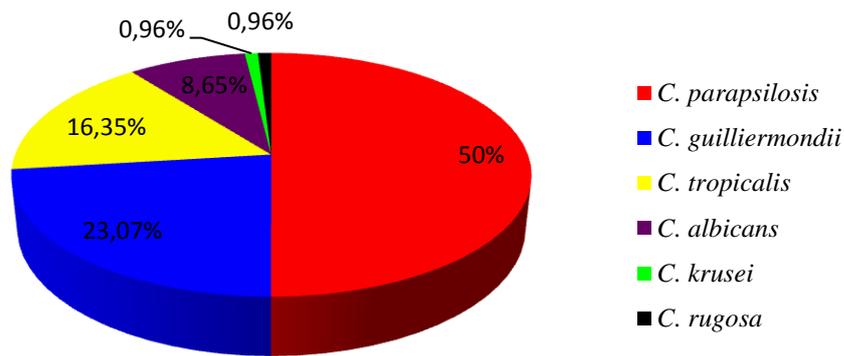


Figura 7: Distribuição percentual de espécies de *Candida* isoladas de lesões dermatológicas.

5.2.2 Fungos Filamentosos

As 100 amostras de fungos filamentosos foram identificadas segundo suas características macro e microscópicas. Foi analisado o tempo de crescimento bem como o aspecto e pigmentação das colônias (Figura 8 A, B e C).

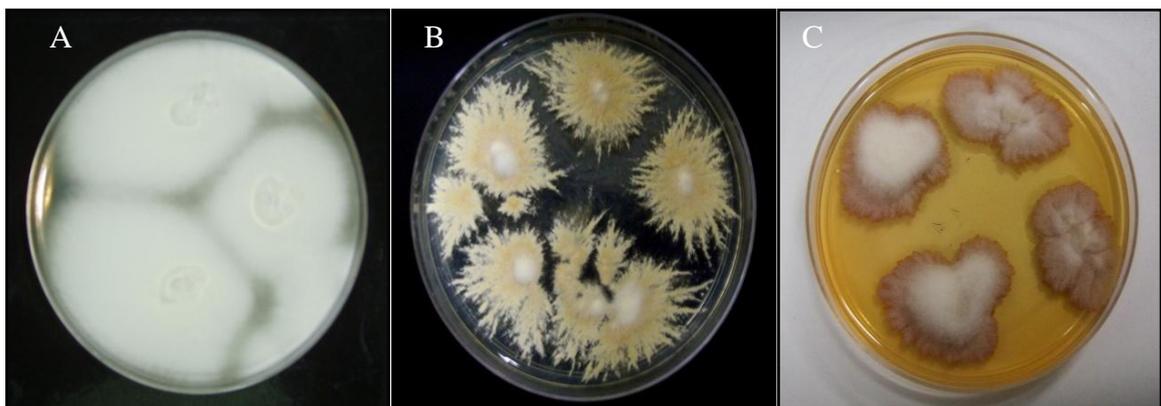
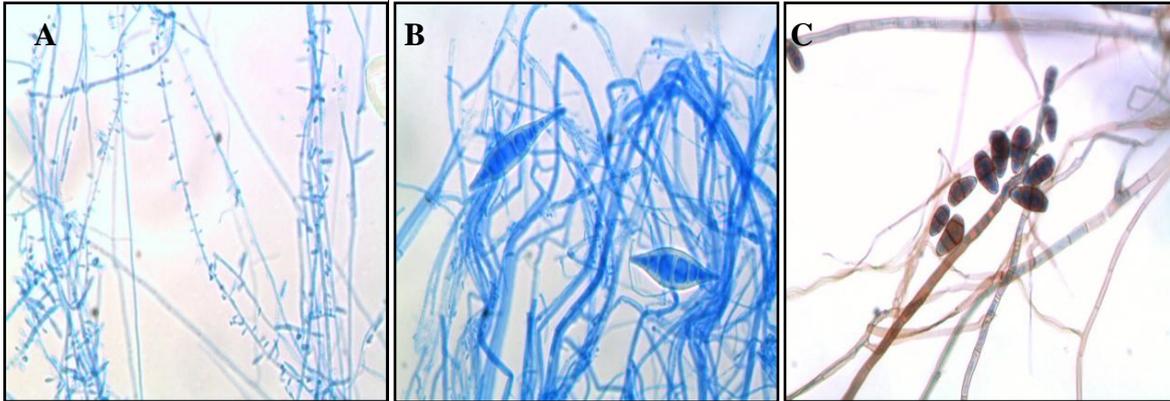


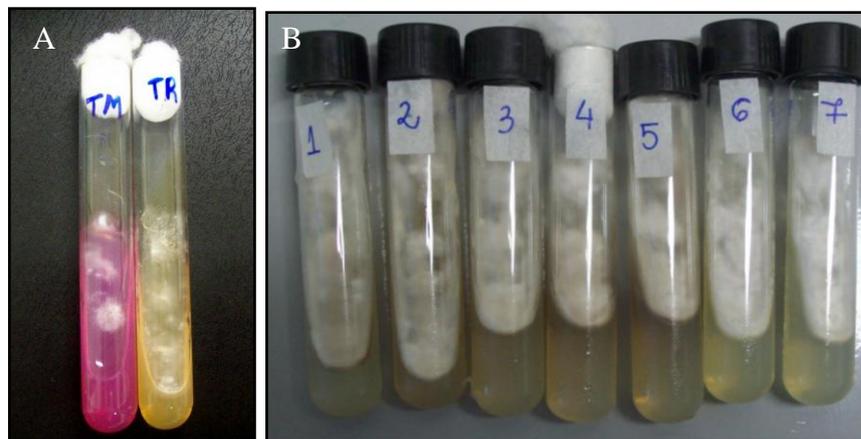
Figura 8: Aspecto macroscópico das colônias de fungos filamentosos em ágar Sabouraud. *T. interdigitale* apresentando colônias de textura algodoadas, coloração branca e crescimento após cerca de 6 a 11 dias (A). *M. gypseum* com colônias pulverulentas e bordas irregulares, de crescimento rápido (3 a 5 dias) e coloração amarelo-acastanhado (B). Colônias de *Fusarium* spp. apresentando textura algodoadas de tom alaranjado e rápido crescimento (2 a 4 dias) (C).

A técnica de microcultivo em lâmina foi realizada permitindo o estudo detalhado das diferentes estruturas dos fungos filamentosos como mostrado na Figura 9.



1
2
3 **Figura 9:** Estruturas microscópicas de fungos filamentosos cultivados em ágar batata dextrose observadas em
4 aumento de 1250X. *T. rubrum* apresentando estruturas microscópicas características com grande quantidade de
5 microconídeos piriformes ao longo das laterais das hifas (A). *M. canis* com macroconídeos multicelulares,
6 fusiformes de parede espessa (B). *Curvularia spp.* apresentando conídeos grandes e demáceos com septos
7 recurvados (C).
8

9
10 A prova da urease foi realizada na diferenciação de *T. interdigitale* (urease
11 positiva) de *T. rubrum* (urease negativa) (Figura 10A). Além disto, testes de requerimento
12 vitamínico foram realizados na identificação de espécies de *Trichophyton* (Figura 10B).
13
14



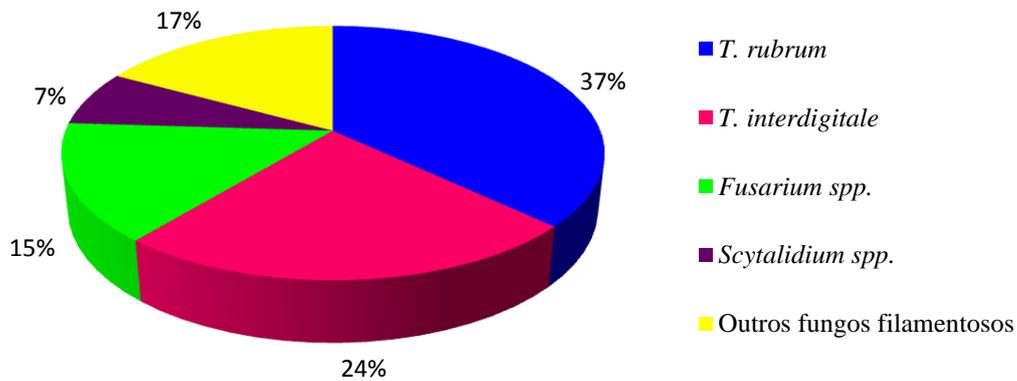
15
16 **Figura 10:** Identificação de *Trichophyton interdigitale*. Teste de uréia positiva para *T. interdigitale* (TM) e
17 negativo para *T. rubrum* (TR) após 7 dias de incubação (A). *T. interdigitale* apresentando bom crescimento em
18 todos os meios de ágar *Trichophyton* após 7 a 10 dias de incubação (B).
19

20
21 Dentre os fungos filamentosos foram identificados 70 fungos dermatófitos (70%)
22 e 30 FFND (30%). *T. rubrum* (n=37) foi a espécie mais isolada seguida de *T. interdigitale*
23 (n=24) e *Fusarium spp.* (n=15). Além destes fungos, foram isolados, ainda, 7 *Scytalidium*

1 spp., 3 *Fonsecaea* spp., 3 *Curvularia* spp., 2 *T. tonsurans*, 2 *T. schoenlenii*, 2 *M. canis*, 2
 2 *Alternaria* spp., 1 *M. gypseum*, 1 *Epidermophyton* sp. e 1 *T. verrucosum* (Figura 11).

3

4



5

6

Figura 11: Distribuição percentual de fungos filamentosos isolados de lesões dermatológicas.

7

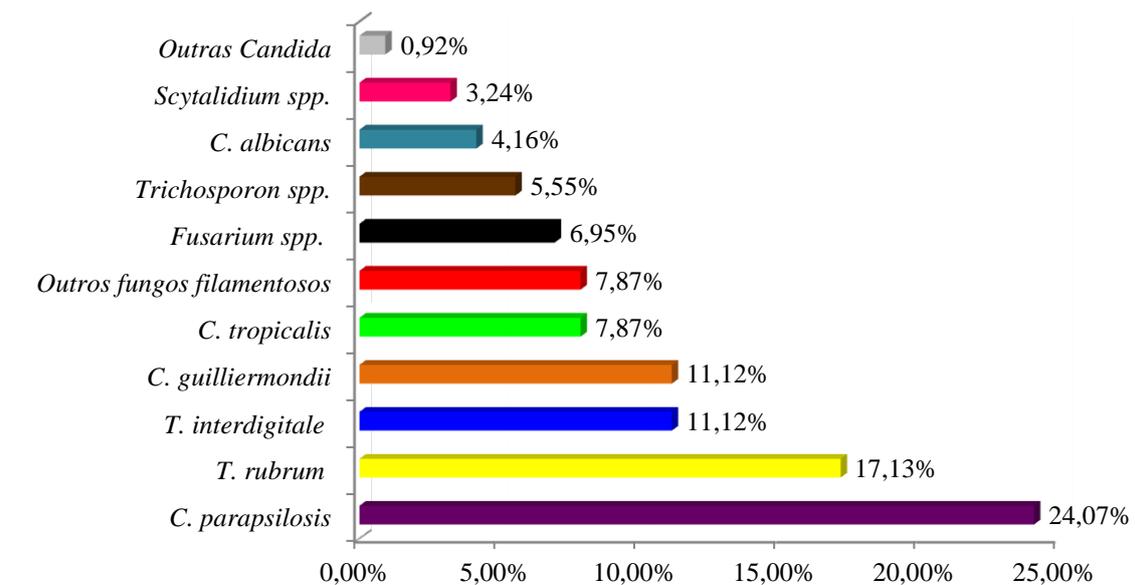
8

9

10 De forma geral, as espécies mais isoladas foram *C. parapsilosis*, *T. rubrum*, *T.*

11

12



13

14

Figura 12: Distribuição percentual das 216 amostras de fungos isolados de dermatomicoses.

15

16

1 A análise da localização das lesões e agentes etiológicos está representada na
2 tabela 6.

Tabela 6: Fungos isolados de lesões dermatológicas segundo o local de infecção e o agente etiológico.

Agente etiológico	Local de infecção							Total
	Mãos	Pés	Unha das mãos	Unha dos pés	Corpo	Face	Couro cabeludo	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Leveduras	11 (5,1)	17 (7,8)	19 (8,8)	44 (20,4)	23 (10,6)	1 (0,5)	1 (0,5)	116 (53,7)
<i>C. parapsilosis</i>	5 (2,3)	5 (2,3)	7 (3,2)	30 (13,9)	5 (2,3)	—	—	52 (24,0)
<i>C. guilliermondii</i>	2 (0,9)	7 (3,2)	5 (2,3)	5 (2,3)	5 (2,3)	—	—	24 (11,1)
<i>C. tropicalis</i>	1 (0,5)	3 (1,4)	5 (2,3)	5 (2,3)	1 (0,5)	1 (0,5)	1 (0,5)	17 (7,8)
<i>C. albicans</i>	2 (0,9)	—	1 (0,5)	1 (0,5)	5 (2,3)	—	—	9 (4,2)
<i>C. krusei</i>	1 (0,5)	—	—	—	—	—	—	1 (0,5)
<i>C. rugosa</i>	—	—	—	1 (0,5)	—	—	—	1 (0,5)
<i>Trichosporon</i> spp.	—	2 (0,9)	1 (0,5)	2 (0,9)	7 (3,2)	—	—	12 (5,5)
Dermatófitos	3 (1,4)	23 (10,7)	2 (0,9)	15 (6,9)	19 (8,8)	3 (1,4)	5 (2,3)	70 (32,5)
<i>T. rubrum</i>	2 (0,9)	12 (5,6)	—	10 (4,6)	10 (4,6)	2 (0,9)	1 (0,5)	37 (17,1)
<i>T. interdigitale</i>	1 (0,5)	8 (3,7)	2 (0,9)	5 (2,3)	7 (3,2)	1 (0,5)	—	24 (11,1)
<i>T. tonsurans</i>	—	2 (0,9)	—	—	—	—	—	2 (0,9)
<i>T. schoenlenii</i>	—	—	—	—	1 (0,5)	—	1 (0,5)	2 (0,9)
<i>T. verrucosum</i>	—	—	—	—	1 (0,5)	—	—	1 (0,5)
<i>M. canis</i>	—	—	—	—	—	—	2 (0,9)	2 (0,9)
<i>M. gypseum</i>	—	—	—	—	—	—	1 (0,5)	1 (0,5)
<i>Epidermophyton</i> sp.	—	1 (0,5)	—	—	—	—	—	1 (0,5)
FFND	1 (0,5)	8 (3,7)	1 (0,5)	12 (5,5)	6 (2,8)	1 (0,5)	1 (0,5)	30 (13,8)
<i>Fusarium</i> spp.	—	3 (1,4)	1 (0,5)	7 (3,2)	3 (1,4)	—	1 (0,5)	15 (6,9)
<i>Scytalidium</i> spp.	1 (0,5)	2 (0,9)	—	4 (1,8)	—	—	—	7 (3,2)
<i>Curvularia</i> spp.	—	1 (0,5)	—	1 (0,5)	—	1 (0,5)	—	3 (1,4)
<i>Fonsecaea</i> spp.	—	1 (0,5)	—	—	2 (0,9)	—	—	3 (1,4)
<i>Alternaria</i> spp.	—	1 (0,5)	—	—	1 (0,5)	—	—	2 (0,9)
Total	15 (6,9)	48 (22,2)	22 (10,2)	71 (32,9)	48 (22,2)	5 (2,3)	7 (3,2)	216 (100)

1 Os dados mostram que as leveduras foram os agentes etiológicos mais
2 comuns de dermatomicoses nas mãos, unhas das mãos e unha dos pés, sendo *C.*
3 *parapsilosis* a espécie mais frequente nestes sítios. Por outro lado, nas lesões dos pés,
4 corpo, face e couro cabeludo foram isolados, predominantemente, fungos filamentosos,
5 sendo a espécie *T. rubrum* a mais comum com exceção das lesões do couro cabeludo,
6 onde houve predomínio do *M. canis*.

7 8 9 5.3 TESTES DE SUSCETIBILIDADE *IN VITRO*

10 11 12 **5.3.1 Leveduras**

13
14
15 Resultados dos testes de suscetibilidade *in vitro* mostram que a maioria das
16 amostras (85,1%) foi sensível aos antifúngicos testados enquanto que 14,9%
17 apresentaram suscetibilidade dose-dependente a dois antifúngicos (fluconazol e
18 itraconazol). A maior taxa de suscetibilidade dose-dependente foi observada com o
19 itraconazol (94%) sendo que, das 16 amostras com este perfil de sensibilidade, 9 eram
20 *C. parapsilosis*, 4 *C. guilliermondii*, 2 *C. albicans* e 1 *C. tropicalis*. Apenas uma
21 amostra de *C. parapsilosis* apresentou suscetibilidade dose-dependente ao fluconazol
22 exibindo CIM de 16 µg/mL. Além disso, a única amostra de *C. krusei* apresentou CIM
23 alto para fluconazol devido à sua resistência intrínseca a este antifúngico. Os outros
24 resultados das CIMs para *C. krusei* foram $\leq 0,03$ µg/mL para cetoconazol, itraconazol e
25 voriconazol e 1 µg/mL para terbinafina. Para a única amostra de *C. rugosa* as CIMs
26 encontradas foram 0,12 µg/mL para cetoconazol e voriconazol, 0,25 µg/mL para
27 itraconazol, 4 µg/mL para fluconazol e 8 µg/mL para terbinafina. Em geral, dentre as
28 espécies de *Candida*, as amostras de *C. albicans* apresentaram os maiores valores de
29 CIMs para os antifúngicos testados. Em todas as amostras observaram-se altos valores
30 de CIMs para a terbinafina sendo a CIM₉₀ invariavelmente maior que 16 µg/mL. Por
31 outro lado, o voriconazol foi o agente mais ativo contra leveduras do gênero *Candida*.

32 Leveduras do gênero *Trichosporon* spp. apresentaram baixos valores de
33 CIMs para os antifúngicos testados, exceto para terbinafina e fluconazol. No entanto,

1 não foi possível analisar casos de dose-dependência ou resistência aos fármacos porque
2 o CLSI não preconiza pontos de corte para estes fungos.

3 Os resultados dos testes de suscetibilidade *in vitro* (CIMs, CIM₅₀, CIM₉₀,
4 média geométrica e suscetibilidade dose-dependente) para as amostras de leveduras
5 encontram-se na tabela 7.

6
7
8 **Tabela 7:** Suscetibilidade *in vitro* de leveduras isoladas de infecções dermatológicas frente a 5
9 antifúngicos.

Leveduras (n=114)	Antifúngicos	CIM (µg/mL)			Média geométrica	Suscetível (%)	Suscetibilidade dose- dependente (%)
		Varição de CIM	CIM ₅₀	CIM ₉₀			
<i>C. parapsilosis</i> (n=52)	CTZ	≤0,031 - 0,25	≤0,031	0,062	0,11	100,0%	-
	FLZ	0,25 - 16	0,50	2,00	0,8	98,1%	1,9%
	ITZ	≤0,031 - 0,5	0,062	0,25	0,12	82,7%	17,3%
	TER	0,125- >16	4	>16	1,64	-	-
	VRZ	≤0,031 - 0,125	≤0,031	0,062	0,08	100,0%	-
<i>C. guilliermondii</i> (n=24)	CTZ	≤0,031 - 0,12	≤0,031	0,062	0,07	100,0%	-
	FLZ	0,125 - 4	1,00	2,00	0,77	100,0%	-
	ITZ	≤0,031 - 0,50	0,125	0,25	0,12	83,3%	16,7%
	TER	0,25 - >16	2	>16	1,74	-	-
	VRZ	≤0,031 - 0,125	≤0,031	0,125	0,09	100,0%	-
<i>C. tropicalis</i> (n=17)	CTZ	≤0,031	≤0,031	≤0,031	≤0,031	100,0%	-
	FLZ	0,25 - 8	0,50	2	0,64	100,0%	-
	ITZ	≤0,031 - 0,25	0,125	0,125	0,1	94,1%	5,9%
	TER	1 - >16	8	>16	2,33	-	-
	VRZ	≤0,031 - 0,062	≤0,031	0,062	0,062	100,0%	-
<i>C. albicans</i> (n=09)	CTZ	≤0,031 - 0,25	≤0,031	0,25	0,17	100,0%	-
	FLZ	0,125- 4	0,25	4	1,14	100,0%	-
	ITZ	≤0,031 - 0,5	0,062	0,5	0,12	77,8%	22,2%
	TER	2 - >16	4	>16	2,63	-	-
	VRZ	≤0,031 - 0,25	≤0,031	0,25	0,12	100,0%	-
<i>Trichosporon</i> spp. (n=12)	CTZ	≤0,031 - 1	≤0,031	1	0,35	-	-
	FLZ	0,25 - 8	0,5	8	0,84	-	-
	ITZ	≤0,031 - 0,25	0,125	0,25	0,11	-	-
	TER	0,5 - >16	4	>16	2	-	-
	VRZ	≤0,031 - 0,125	≤0,031	0,125	0,09	-	-

10 CTZ = Cetoconazol, FLZ= Fluconazol, ITZ= Itraconazol, TER= Terbinafina, VRZ= Voriconazol, CIM=
11 concentração inibitória mínima, CIM₅₀= concentração que inibe 50% das amostras analisadas, CIM₉₀=
12 concentração que inibe 90% das amostras analisadas.

5.3.2 Fungos Filamentosos

Dermatófitos e fungos filamentosos não-dermatófitos apresentaram padrões distintos de suscetibilidade frente aos antifúngicos testados. Os dermatófitos demonstraram baixos valores de CIMs para terbinafina, voriconazol e itraconazol. A única amostra de *M. gypseum* apresentou CIM de 64 µg/mL para fluconazol enquanto que para os outros antifúngicos, as CIMs encontradas foram baixas (2 µg/mL para cetoconazol e griseofulvina, 0,25 µg/mL para itraconazol, 0,06 µg/mL para voriconazol e ≤0,03 µg/mL para terbinafina). As duas amostras de *M. canis* isoladas apresentaram CIM de 16 µg/mL para fluconazol e baixos valores de CIMs para os demais antifúngicos. Terbinafina foi o agente mais potente contra dermatófitos, seguida pelo voriconazol e itraconazol (Tabela 8).

Fungos filamentosos não dermatófitos mostraram sensibilidade diminuída aos antifúngicos testados. Espécies do gênero *Fusarium* spp. apresentaram as maiores CIMs para todos os antifúngicos testados. Mais de 90% destes fungos apresentaram CIM >64 µg/mL para griseofulvina. Este antifúngico juntamente com o fluconazol apresentou as maiores médias geométricas. De forma geral, o voriconazol mostrou os menores valores de CIM como observado pelas médias geométricas, mas duas amostras (13,3%) de *Fusarium* spp apresentaram CIM >16 µg/mL para esse antifúngico.

Valores de CIMs, CIM₅₀, CIM₉₀ e a média geométrica dos testes de suscetibilidade *in vitro* para fungos filamentosos estão demonstrados na tabela 8.

1 **Tabela 8:** Atividade *in vitro* de agentes antifúngicos para 100 amostras de fungos filamentosos isolados
 2 de lesões dermatológicas.

Fungos filamentosos (n=100)	Antifúngicos	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			Média geométrica
		Varição de CIM	CIM ₅₀	CIM ₉₀	
<i>T. rubrum</i> (n=37)	CTZ	$\leq 0,031 - 4$	0,5	2	0,46
	FLZ	$2 - \geq 64$	16	≥ 64	11,2
	GRI	$0,25 - >64$	2	8	1,9
	ITZ	$\leq 0,031 - 1$	0,125	0,5	0,22
	TER	$\leq 0,031 - 0,062$	$\leq 0,031$	$\leq 0,031$	0,06
	VRZ	$\leq 0,031 - 4$	$\leq 0,031$	0,25	0,18
<i>T. interdigitale</i> (n=24)	CTZ	$\leq 0,031 - \geq 64$	0,25	2	0,46
	FLZ	$2 - \geq 64$	8	≥ 64	5,9
	GRI	$0,12 - >64$	2	32	1,56
	ITZ	$\leq 0,031 - 2$	0,125	0,5	0,19
	TER	$\leq 0,031$	$\leq 0,031$	$\leq 0,031$	0,03
	VRZ	$\leq 0,031 - 1$	0,062	0,5	0,24
Outros fungos dermatófitos* (n=09)	CTZ	$\leq 0,031 - 2$	0,125	2	0,27
	FLZ	$1 - \geq 64$	16	32	11,31
	GRI	$1 - >64$	2	4	1,34
	ITZ	$\leq 0,031 - 0,5$	0,062	0,25	0,17
	TER	$\leq 0,031$	$\leq 0,031$	$\leq 0,031$	0,03
	VRZ	$\leq 0,031 - 0,062$	$\leq 0,031$	0,062	0,06
<i>Fusarium</i> spp. (n=15)	CTZ	$4 - \geq 16$	≥ 16	≥ 16	8,9
	FLZ	$16 - \geq 64$	≥ 64	≥ 64	22,6
	GRI	$16 - >64$	>64	>64	25,4
	ITZ	$4 - >16$	>16	>16	5,65
	TER	$4 - >16$	>16	>16	4
	VRZ	$1 - >16$	4	>16	3,6
Outros FFND** (n=15)	CTZ	$1 - \geq 16$	8	≥ 16	1,6
	FLZ	$2 - \geq 16$	8	≥ 16	11,3
	GRI	>64	>64	>64	64
	ITZ	$0,25 - \geq 16$	8	≥ 16	0,57
	TER	$0,5 - >16$	2	8	1,6
	VRZ	$0,06 - 8$	1	8	1

3 CTZ = Cetoconazol, FLZ= Fluconazol, GRI = Griseofulvina, ITZ= Itraconazol, TER= Terbinafina,
 4 VRZ= Voriconazol, CIM= concentração inibitória mínima, CIM₅₀= concentração que inibe 50% das
 5 amostras analisadas, CIM₉₀= concentração que inibe 90% das amostras analisadas, FFND= fungos
 6 filamentosos não-dermatófitos. (*) *T. schoenleinii* (n=2), *T. tonsurans* (n=2), *M. canis* (n=2), *T.*
 7 *verrucosum* (n=1), *M. gypseum* (n=1), *Epidermophyton floccosum* (n=1). (**) *Scytallidium* spp. (n=7),
 8 *Curvularia* spp. (n=3), *Fonsecaea* spp. (n=3), *Alternaria* spp. (n=2)

9

10

11

5.4 FATORES DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS

5.4.1 Atividade de fosfolipases

Trinta e nove (33,6%) leveduras foram produtoras de fosfolipase sendo 31 do gênero *Candida* e 8 do gênero *Trichosporon*. A espécie de *Candida* com maior porcentagem de amostras produtoras de fosfolipase foi *C. albicans* (88,9%), seguida por *C. tropicalis* (58,8%). Entretanto, *C. tropicalis* apresentou maior porcentagem de amostras com atividade muito alta de fosfolipase (40%). Das espécies de *Candida* spp. com atividade enzimática positiva, 10 (32,3%) eram provenientes das unhas dos pés, 8 (25,8%) do corpo, 6 (19,3%) dos pés, 5 (16,1%) das unhas das mãos, 1 (3,2%) da mão e 1 (3,2%) da face. Atividade enzimática muita alta foram encontradas em 2 isolados da pele, 2 isolados das unhas das mãos e 1 isolado da face.

As leveduras do gênero *Trichosporon* apresentaram alta porcentagem de amostras produtoras de fosfolipase sendo que todas foram classificadas como atividade positiva e nenhuma apresentou alta atividade. Destas, 4 foram isoladas do corpo (pele), 2 das unhas dos pé e 2 do pé.

A avaliação da atividade enzimática está apresentada na tabela 9.

5.4.2 Atividade de proteinases

Das 116 amostras de leveduras analisadas, 47 (40,5%) apresentaram atividade de proteinase. Quarenta e cinco isolados de *Candida* (43,2%) demonstraram atividade de proteinase, das quais 26 eram *C. parapsilosis*, 10 *C. guilliermondii*, 6 *C. tropicalis* e 3 *C. albicans*. Cinquenta por cento das *C. parapsilosis* isoladas apresentaram atividade enzimática positiva e destas, 57,7% apresentaram atividade alta ou muito alta da exoenzima. Contudo, dentre todas as espécies de *Candida* spp. produtoras de proteinases, a *C. guilliermondii* foi a espécie com maior porcentagem de amostras com alta ou muito alta atividade enzimática (70%). Dentre as espécies de *Candida* produtoras de proteinase, 24 (53,3%) amostras eram das unhas dos pés, 13 (28,9%) das

1 unhas das mãos, 4 (8,9%) dos pés, 2 (4,4%) do corpo, 1 (2,2%) da mão e 1 (2,2%) de
2 couro cabeludo. Das amostras de *C. parapsilosis* com atividade de proteinase, 17
3 (65,4%) foram isoladas nas unhas dos pés dentre as quais, 3 demonstraram atividade
4 enzimática muito alta.

5 Das 12 amostras de *Trichosporon* spp., apenas 2 apresentaram atividade
6 enzimática baixa sendo que estas amostras foram isoladas do corpo (pele).

7 Os resultados da avaliação da produção da atividade de proteinases estão
8 apresentados na tabela 9.

9 Dez amostras apresentaram atividade simultânea das enzimas sendo que
10 todas eram do gênero *Candida*. Três amostras de *C. albicans* produtoras de fosfolipase
11 também foram produtoras de proteinase. Dentre as leveduras com atividade enzimática
12 simultânea 5 eram das unhas dos pés, 2 dos pés, 2 da pele e 1 das unhas das mãos.

Tabela 9: Atividade de fosfolipases e proteinases das 116 leveduras isoladas.

Leveduras (n= 114)	Fosfolipase				Proteinase						Produção simultânea n (%)
	NP	P	AP	AMA	NP	P	AMB	AB	AA	AMA	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>C. parapsilosis</i> (n=52)	44 (84,6)	8 (15,4)	8 (100)	-	26 (50)	26 (50)	2 (7,7)	9 (34,6)	11 (42,3)	4 (15,4)	2 (3,84)
<i>C. guilliermondii</i> (n=24)	20 (83,3)	4 (16,7)	3 (75)	1 (25)	14 (58,3)	10 (41,67)	-	3 (30)	6 (60)	1 (10)	2 (8,3)
<i>C. tropicalis</i> (n=17)	7 (41,2)	10 (58,8)	6 (60)	4 (40)	11 (64,7)	6 (35,3)	1 (16,7)	2 (33,3)	1 (16,7)	2 (33,3)	3 (17,6)
<i>C. albicans</i> (n=9)	1 (11,1)	8 (88,9)	7 (87,5)	1 (12,5)	6 (66,7)	3 (33,3)	-	2 (66,7)	1 (33,3)	-	3 (33,3)
<i>C. krusei</i> (n=1)	1 (100)	-	-	-	1 (100)	-	-	-	-	-	-
<i>C. rugosa</i> (n=1)	-	1 (100)	1 (100)	-	1 (100)	-	-	-	-	-	-
<i>Trichosporon spp.</i> (n=12)	4 (33,3)	8 (66,7)	8 (100)	-	10 (83,3)	2 (16,7)	-	2 (100)	-	-	-
Total	77	39	33	6	69	47	3	18	19	7	10

NP= não produtor, P= produtor, AP= atividade positiva, AMA= atividade muito alta, AMB= atividade muito baixa, AA= atividade alta

6 DISCUSSÃO

A prevalência de dermatomicoses aumentou muito nas últimas décadas (HAVLICKOVA et al., 2008) e, atualmente, elas são consideradas uma das doenças dermatológicas mais comuns, apresentando ampla distribuição mundial. São, portanto, importantes causas de morbidade, principalmente em países tropicais (CHARLES, 2009; SIMONNET et al., 2011; ROTTA et al., 2012) e, em alguns países, são consideradas um dos principais problemas de saúde pública (WOODFOLK, 2005; ADELEKE et al., 2008). Estas infecções são causadas por fungos dermatófitos, fungos filamentosos não-dermatófitos e leveduras e a prevalência deles é variável de acordo com as diferenças regionais (KOKSAL et al., 2009).

Em nosso estudo foram identificadas 216 amostras de fungos isoladas de dermatomicoses, sendo que adultos entre 30 e 60 anos foram os mais acometidos (52,8%). Estes resultados corroboram aqueles encontrados por CHOAPPA et al. (2011) os quais mostraram que cerca de 37,8% dos indivíduos com dermatomicoses tinham idade entre 36 e 60 anos. Analisando o grupo entre 16 e 60 anos, ele representou 74,1% dos pacientes acometidos em nosso trabalho e, KOKSAL et al. (2009) mostraram que 98,0% dos indivíduos com dermatomicoses apresentavam esta mesma faixa etária. Adultos podem ser mais afetados porque estão mais expostos a fatores predisponentes como o uso prolongado de sapatos fechados e de materiais sintéticos que contribuem para a sudorização. O uso excessivo de antibióticos e a pré-existência de traumas também podem contribuir para o desenvolvimento das infecções nos adultos (HERNANDEZ-SALAZAR et al., 2007).

Dentre as amostras analisadas, 60,6% eram provenientes de infecções em mulheres. Outros estudos também encontraram maior ocorrência de dermatomicoses em mulheres (CAMPANHA et al., 2007; ABANMI et al., 2008; SIMONNET et al., 2011). Entretanto, LUPA et al. (1999) e KOKSAL et al. (2009) relataram maior ocorrência de dermatomicoses em indivíduos do sexo masculino. Por sua vez, LOPEZ-MARTINEZ et al. (2010) encontraram ocorrência semelhante entre os gêneros ao estudarem 2084 casos de infecções superficiais (49,6% indivíduos do sexo masculino e 50,4% do sexo feminino). A discrepância destes dados pode estar associada ao fato das mulheres procurarem mais o serviço de saúde para diagnóstico e tratamento das infecções e, além disso, elas estão mais frequentemente em contato com atividades ocupacionais

1 relacionadas ao preparo de alimentos e limpeza doméstica (CAMPANHA et al., 2007).
2 Entre o grupo de 0 a 15 anos observou-se que 53,8% eram do gênero masculino e
3 46,2% do gênero feminino. Resultados semelhantes foram encontrados por
4 KOUSSIDOU-EREMONDI et al. (2005) ao relatarem que 54% das crianças com
5 dermatomicoses eram do sexo masculino e 46% do sexo feminino. Dados semelhantes
6 também foram observados em um estudo com 137 casos de dermatofitoses em crianças,
7 o qual revelou que 53,3% destas eram do sexo masculino e 46,7% do sexo feminino
8 (FERNANDES et al., 2001).

9 Em nosso estudo, 46,1% das infecções em crianças ocorreram nos pés e
10 estiveram associadas à presença de leveduras do gênero *Candida* em 50% dos casos. O
11 estudo de dermatomicoses em crianças de Barcelona realizado por PÉREZ-
12 GONZÁLEZ et al. (2009) mostrou que 91,2% das crianças avaliadas apresentaram
13 infecção nos pés causadas principalmente por *T. rubrum* e *T. interdigitale*. O aumento
14 de *tinea pedis* em crianças está associado ao uso de sapatos fechados e atividades
15 esportivas nas quais o uso de materiais comuns e quadras públicas favorecem a sua
16 transmissão. KOUSSIDOU-EREMONDI et al. (2005) também isolaram *Candida* em
17 crianças, entretanto, estes fungos foram isolados em diferentes locais do corpo (unhas,
18 glúteo e virilha) e foram associados aos seguintes fatores: descuido das mães com
19 crianças que fazem uso de fraudas, uso excessivo de antibióticos, diarreias crônicas e os
20 atos de chupar os dedos e brincar constantemente com água. Contudo, nós encontramos
21 apenas um caso de *tinea corporis* associada à presença de *Candida* spp. Das
22 dermatomicoses encontradas em crianças, foram evidenciados três casos de infecção no
23 couro cabeludo (23,07%), os quais estiveram associados à fungos do gênero
24 *Microsporum*. KOUSSIDOU-EREMONDI et al. (2005) observaram a ocorrência de
25 *tinea capitis* em 48% das crianças estudadas, sendo que todas foram causadas por
26 dermatófitos, principalmente por *M. canis*. FERNANDES, et al. (2001) encontraram
27 maior ocorrência desta infecção (57%), sendo o *M. canis*, também, o responsável pela
28 maioria delas. Entretanto, o estudo de PÉREZ-GONZÁLEZ et al. (2009) revelou que
29 apenas 5,9% das dermatomicoses em crianças ocorreram no couro cabeludo. Fungos do
30 gênero *Microsporum* são associados a infecções no couro cabeludo e *M. gypseum*, por
31 exemplo, já foi isolado em piso de ginásios públicos bem como em animais saudáveis e
32 PÉREZ-GONZÁLEZ et al. (2009) sugerem que estes achados devem ser considerados
33 por médicos pediatras e que medidas preventivas devem ser tomadas, principalmente
34 nas escolas, a fim de evitar a propagação das infecções causadas por essa espécie.

1 Em nosso trabalho, um caso de *tinea capitis* por *C. tropicalis* foi encontrado
2 em um indivíduo de 16 anos. DAS et al. (2007) também identificaram casos de *tinea*
3 *capitis* causados por espécies de *Candida*, num total de 10 casos, dos quais 2 por *C.*
4 *tropicalis* e 8 por *C. albicans*. No entanto, estes foram observados em indivíduos com
5 idade inferior a 15 anos.

6 Nosso trabalho mostra que indivíduos a partir dos 16 anos foram mais
7 acometidos por leveduras do gênero *Candida* (49,2%) e dermatófitos (31,5%) e as
8 espécies mais comumente encontradas foram *C. parapsilosis* e *T. rubrum* com
9 ocorrência em 25,1% e 16,7% dos casos, respectivamente. Porém, KOKSAL et al.
10 (2009) observaram que nesta mesma faixa etária, 72,5% das dermatomicoses foram
11 causadas por dermatófitos, seguida de *Candida* spp. (20,1%).

12 Onicomicose (45,3%) seguida de *tinea corporis* (22,67%) e *tinea pedis*
13 (20,69%) foram os tipos de lesões mais encontradas nos indivíduos a partir dos 16 anos.
14 Considerando apenas as infecções nas unhas dos pés, elas ocorreram em 34,48% dos
15 indivíduos analisados e foram causadas principalmente por *C. parapsilosis* (42,85%) e
16 *T. rubrum* (14,8%). Um estudo de PELEGRINI et al. (2009) em São Bernardo do
17 Campo revelou que cerca de 61,8% das dermatomicoses ocorreram nas unhas dos pés e
18 foram causadas por leveduras do gênero *Candida* em mais de 55% dos casos. Além
19 disso, eles observaram que a espécie de *Candida* mais encontrada foi *C. albicans* e,
20 entre dermatófitos, o *T. interdigitale* foi mais isolado que *T. rubrum*. ATAÍDES et al.
21 (2011) estudando onicomicoses em Goiânia constataram que, em relação à frequência
22 dos grupos de fungos associados às lesões, encontraram resultados semelhantes aos
23 observados em nosso trabalho, pois, as leveduras foram responsáveis por 56,8% das
24 onicomicoses, seguida de dermatófitos (30,4%) e FFND (12,7%). Outro dado
25 semelhante foi referente às espécies mais comumente isoladas, onde *C. parapsilosis* foi
26 o principal fungo isolado (30,5%) seguido por *T. rubrum* (22,5%).

27 Segundo o estudo de revisão sobre onicomicoses de WELSH et al. (2010) a
28 incidência de onicomicoses aumenta com a idade e, cerca de 30% de pacientes com este
29 tipo de infecção são maiores de 60 anos. Nossos resultados mostram porcentagem
30 menor de indivíduos, nesta faixa etária, com esta infecção, pois dentre todos os
31 indivíduos com onicomicoses, 10,6% eram maiores de 60 anos. Todavia, vários estudos
32 comprovam o aumento da ocorrência de onicomicoses com o avançar da idade
33 (MARTINS et al., 2007; DAS et al. 2007; GODOY-MARTINEZ et al. 2009;
34 HASHEMI et al., 2009).

1 Onicomicoses são as infecções mais comuns nas unhas e predominam em
2 indivíduos adultos e, embora, tradicionalmente, a *C. albicans* tenha sido a espécie mais
3 isolada neste tipo de infecção, atualmente outras espécies de *Candida* têm emergido e
4 vários trabalhos relatam a ocorrência crescente de *C. parapsilosis* isoladas de
5 onicomicoses (TROFA et al., 2008; MANZANO-GAYOSSO et al., 2011; ATAÍDES et
6 al. 2011). Segundo o estudo de WELSH et al. (2010), a maioria das onicomicoses é
7 causada por dermatófitos (principalmente *T. rubrum* e *T. interdigitale*). No entanto,
8 diferentes estudos, assim como o nosso, têm mostrado que leveduras são importantes
9 agentes etiológicos destas infecções e que sua ocorrência pode até mesmo ultrapassar a
10 ocorrência de dermatófitos (PELEGRINI et al., 2009; ATAÍDES et al., 2011).

11 Observando estudos desde a década de 40, LOPEZ-MARTINEZ et al
12 (2010) mostraram aumento na ocorrência de onicomicoses concomitantemente com a
13 diminuição da ocorrência de *tinea capitis* e *tinea corporis* no México. Junto com estas
14 mudanças, notam-se que alterações na ocorrência de espécies de fungos causadores de
15 micoses dermatológicas podem estar associadas à capacidade adaptativa dos fungos às
16 condições do hospedeiro, além de outros fatores como a melhora nos hábitos higiênicos
17 que contribuem, por exemplo, para a diminuição de infecções no couro cabeludo. A
18 procura por diagnóstico e tratamento de infecções nas unhas contribui para o aumento
19 no relato de casos de onicomicoses, principalmente nas unhas dos pés, visto que
20 infecções nessas unhas afetam muito a qualidade de vida dos acometidos, pois podem
21 causar desconforto e dor, o que dificulta caminhadas e a realização de atividades diárias.
22 Somados a isto, o uso de calçados fechados e as práticas esportivas associadas ao lento
23 crescimento das unhas dos pés se comparada às unhas das mãos proporcionam ao fungo
24 mais oportunidade para causar doença nas unhas dos pés (PELEGRINI et al., 2009;
25 LOPEZ-MARTINEZ et al, 2010).

26 Em nosso trabalho, leveduras do gênero *Trichosporon* spp. representaram
27 5,55% dentre todas as amostras e estes achados concordam com aqueles obtidos por
28 BENTUBO (2008) que encontrou 4,6% desta levedura. Fungos do gênero *Trichosporon*
29 acometeram apenas indivíduos adultos no trabalho de KOKSAL et al. (2009) enquanto
30 que em nosso estudo observamos resultados semelhantes, pois apenas 1 isolado de
31 *Trichosporon* spp. foi obtido em crianças até os 15 anos e todas as outras 11 amostras
32 foram isoladas de adultos. Nossos resultados mostram que leveduras do gênero
33 *Trichosporon* spp. estiveram associadas a infecções na pele (58,3%) e KOKSAL et al
34 (2009), verificaram que 50% dos isolados foram provenientes, também, de infecções

1 neste local. Por outro lado, TAJ-ALDEEN et al. (2009) analisaram 27 amostras de
2 *Trichosporon* spp. e observaram que 25,9% eram de onicomicoses e 7,4% dos pés.

3 Nossos dados mostram que dermatófitos foram isolados em 32,4% das
4 infecções dermatológicas com predomínio da espécie *T. rubrum* (52,8%), seguida de *T.*
5 *interdigitale* (34,3%). BRAJAC et al. (2003) observaram uma porcentagem de
6 dermatofitose um pouco maior que a nossa (36,9%) na Croácia, entretanto, os
7 dermatófitos mais isolados foram *T. interdigitale* (54,1%) e *M. canis* (35%). Já o estudo
8 de KOKSAL et al. (2009), na Turquia, mostrou que estes fungos foram responsáveis
9 por 74% das infecções analisadas sendo *T. rubrum* encontrado em 56% das lesões e *T.*
10 *interdigitale* em 14% delas. Por outro lado, na Tunísia, NEJI et al. (2009) isolaram *T.*
11 *rubrum* em 74,5% das dermatofitoses seguido de *T. violaceum* (7,9%) e *T. interdigitale*
12 (7,5%).

13 No Brasil, estudos mostram diferentes taxas na ocorrência de
14 dermatofitoses: 32,7% em São Bernardo do Campo/São Paulo (PELEGRINI et al.,2009)
15 e 21,2% em Maringá/Paraná (CAMPANHA et al.,2007). *T. schoenleinii* e *T. tonsurans*
16 foram os dermatófitos mais encontrados em São Bernardo do Campo (35,3% e 29,4%,
17 respectivamente) e, em Maringá, embora os autores não tenham mostrado a
18 identificação das diferentes espécies de dermatófitos, fungos do gênero *Trichophyton*
19 foram os mais encontrados. Esses dados ilustram o fato de que a prevalência dos fungos
20 causadores de dermatomicoses varia nas diferentes áreas geográficas, evidenciando a
21 importância de estudos epidemiológicos em cada região.

22 Nossos dados mostram que, dentre as dermatofitoses, o tipo de infecção
23 predominante foi a *tinea pedis* (47,9%) sendo *T. rubrum* o principal agente etiológico
24 desta infecção (52,1%). Além disto, dentre os dermatófitos, o *T. rubrum* foi, ainda, o
25 principal fungo isolado em onicomicoses dos podóctilos (66,7%) e de *tinea corporis*
26 (52,6%). A alta ocorrência de *tinea pedis* e onicomicoses nas unhas dos pés também foi
27 observada em outros trabalhos e *T. rubrum* foi o principal agente etiológico na maioria
28 dos casos (BRAJAC et al., 2003; DAS et al., 2007; KOKSAL et al, 2009; NEJI et al.,
29 2009; PELEGRINI et al., 2009, AKCAGLAR et al., 2011; DRAKENSJÖ e
30 CHRYSSANTHOU, 2011). Dentre os dermatófitos, *T. rubrum* é o principal agente
31 etiológico de onicomicose nos podóctilos: 69,5% no Ceará (BRILHANTE et al., 2000),
32 55,3% em Goiânia (SOUZA et al., 2009) e 33,2% em São Paulo (GODOY-MARTINEZ
33 et al., 2009). Embora as dermatofitoses não sejam graves, em termos de mortalidade ou
34 sequelas físicas, elas têm significativas consequências clínicas em termos de estética,

1 cronicidade e dificuldades terapêuticas. As diferenças encontradas entre os dados
2 podem ser explicadas pela associação de vários fatores como as condições climáticas,
3 hábitos culturais e higiênicos, desenvolvimento socioeconômico, patogenicidade das
4 espécies, acesso ao sistema de saúde pública, processos de migração e turismo bem
5 como a presença de fatores predisponentes nos indivíduos (diabetes, doenças arteriais,
6 tabagismo, dentre outros) (KOKSAL et al., 2009; AKCAGLAR et al., 2011;
7 DRAKENSJÖ e CHRYSSANTHOU 2011; TSOUMANI et al., 2011).

8 Fungos filamentosos não-dermatófitos foram isolados em 13,8% das lesões
9 e fungos do gênero *Fusarium* (50%) foram os mais encontrados, seguido de *Scytalidium*
10 spp. (23,3%). Estudos analisando a ocorrência de FFND em dermatomicoses têm
11 isolado principalmente *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. (DAS et al., 2007; ABANMI et
12 al., 2008; HASHEMI et al., 2009; CHOAPPA et al., 2011) e, além destes, outros FFND
13 também são encontrados com menor frequência (*Scytalidium* spp., *Alternaria* spp.,
14 *Scopulariopsis* spp., *Penicillium* spp e *Acremonium* spp.) (ESCOBAR e CARMONA-
15 FONSECA, 2003; MARTINS et al., 2007, CHOAPPA et al., 2011; SIMONNET et al.,
16 2011).

17 No Brasil, 2 estudos revelaram ocorrência distinta, dentre FFND com
18 relação às espécies de *Fusarium* spp. MARTINS et al. (2007) e ATAÍDES et al. (2010)
19 considerando apenas casos de onicomicoses, encontraram *Fusarium* spp em 24,4% e
20 44,4% dos casos, respectivamente. Com relação ao isolamento de *Scytalidium* spp., os
21 dados destes trabalhos são semelhantes (23,2% e 23,07%, respectivamente) e condizem
22 com o encontrado em nosso estudo (23,3%). Nosso trabalho mostra que, dentre os sítios
23 de infecção, 43,3% dos FFND foram isolados das unhas (87,5% dos podáctilos e 12,5%
24 dos quirodáctilos), 26,6% isolados dos pés e 20% do corpo. Estes achados corroboram
25 os dados de ROMANO et al. (2005); DAS et al. (2007); BUENO et al. (2009) e
26 HASHEMI et al. (2009), onde FFND foram associados predominantemente à
27 ocorrência de onicomicoses.

28 ROMANO et al. (2005) revelaram a ocorrência de *tinea pedis* e *tinea*
29 *manuum* em cerca de 10% dos indivíduos com infecções por *Fusarium* spp. Além disto,
30 nossos dados mostram que *Fusarium* spp. foi encontrado em 8,6% (08) dos casos de
31 onicomicoses (93) estudados e resultados semelhantes foram relatados por outros
32 autores no Brasil (8,18%) (BRILHANTE et al., 2005) e na Colômbia (9,7%) (BUENO
33 et al., 2009). A incidência de onicomicoses causadas por FFND tem aumentado
34 drasticamente nos últimos anos. Dados mostram que FFND podem ser potenciais causas

1 de onicomicoses, entretanto, como estes fungos são comumente encontrados como
2 contaminantes de solos e laboratórios, e podem invadir as unhas e pele, especialmente
3 de indivíduos que caminham descalços, infecções causadas por eles ainda não são bem
4 esclarecidas (BUENO et al., 2009; HASHEMI et al., 2009; SOUZA et al., 2009). FFND
5 são considerados como agentes etiológicos de dermatomicoses quando ocorre
6 crescimento reprodutível destes após repetidas culturas e coletas com ausência de
7 crescimento de dermatófitos e leveduras em todas as culturas (HASHEMI et al., 2009;
8 SOUZA et al., 2009). No entanto, em nosso trabalho não foi possível realizar repetidas
9 culturas a partir das amostras clínicas porque, como descrito anteriormente, nossas
10 amostras nos foram enviadas após o isolamento e identificação prévia dos fungos, sendo
11 utilizadas apenas amostras positivas ao exame direto e na cultura.

12 Em nosso estudo, não detectamos *Candida* resistentes aos agentes
13 antifúngicos testados, no entanto, 15,38% das *Candida* mostraram suscetibilidade dose-
14 dependente ao itraconazol, das quais 56,25% foram amostras de *C. parapsilosis*.
15 ZEPELIN et al. (2007), em um estudo de candidemias na Alemanha, encontraram
16 porcentagem de *Candida* spp. com suscetibilidade dose-dependente ao itraconazol um
17 pouco maior que a nossa (19,1%), embora tenham verificado também 17,6% de
18 amostras resistentes a esse antifúngico. MANZANO-GAYOSSO et al. (2011),
19 estudando micoses dermatológicas, encontraram 15,06% de espécies de *Candida*
20 resistentes ao itraconazol, sendo 36% *C. guilliermondii*. Contudo, BUENO et al (2009)
21 mostraram que *C. parapsilosis* isoladas de onicomicoses foram altamente sensíveis ao
22 itraconazol. Em geral, o voriconazol foi o agente com melhor atividade sobre *Candida* e
23 este achado é relatado por vários autores (TROFA et al., 2008; BUENO et al., 2009;
24 RAMBACH et al., 2011).

25 Elevadas CIMs foram encontradas para estas leveduras frente a terbinafina e
26 isto corrobora estudos anteriores que mostram que as infecções superficiais por *Candida*
27 são tratadas, com sucesso, por derivados azólicos (principalmente fluconazol e
28 itraconazol) e a terbinafina não apresenta boa atividade contra estes microrganismos
29 (RYDER et al., 1998; JESSUP et al, 2000; BUENO et al., 2009; JAYATILAKE et al.,
30 2009; CARRILLO-MUNÓZ et al., 2010). GUPTA et al. (2005), avaliando a atividade
31 de diferentes antifúngicos para dermatófitos, FFND e leveduras, mostraram que para as
32 espécies de *Candida* spp. o fármaco com menor atividade foi a terbinafina. JESSUP e
33 colaboradores (2000), avaliando a atividade *in vitro* da terbinafina, mostraram grande
34 variação nos valores das CIMs deste antifúngico e o mesmo foi visto em nosso trabalho.

1 Esses autores sugerem que a droga possa ter considerável efeito sobre leveduras,
2 entretanto isto ainda é controverso.

3 As amostras de *Trichosporon* spp. apresentaram, de modo geral, baixos
4 valores de CIM aos azóis testados. O voriconazol foi a agente mais ativo contra
5 *Trichosporon* spp. e baixos valores de CIMs para este antifúngico contra espécies de
6 *Trichosporon* também foram observadas em outros estudos (PAPHITOU et al., 2002;
7 RODRIGUEZ-TUDELA et.al., 2005; TAJ-ALDEEN et al., 2009; GUINEA et al.,
8 2010). Estes dados também estão de acordo com CHAGAS-NETO et al. (2008) os quais
9 sugerem que novos triazólicos (voriconazol, ravuconazol e posaconazol) sejam muito
10 efetivos no tratamento de infecções por *Trichosporon* e que possam ser mais ativos que
11 a anfotericina B. Embora não existam pontos de corte definidos sobre a suscetibilidade a
12 antifúngicos para *Trichosporon*, nós observamos que os outros azóis (cetoconazol e
13 itraconazol) também apresentaram boa atividade contra estes fungos. Isto está de acordo
14 com dados da literatura que trazem os agentes azólicos como ótimas opções
15 terapêuticas, embora um trabalho realizado por BENTUBO (2008) em São Paulo tenha
16 constatado altos valores de CIMs para todos os agentes azólicos testados nas diferentes
17 espécies de *Trichosporon* analisadas.

18 Dentre os dermatófitos, a terbinafina foi o antifúngico mais potente *in vitro*
19 e isto já foi descrito por vários autores. Este fato pode ser umas das explicações para a
20 ampla utilização deste composto no tratamento de onicomicoses e quaisquer infecções
21 por dermatófitos (CETINKAYA et al., 2005; BARROS et al., 2007; CARRILLO-
22 MUÑOZ et al., 2010; HUANG et al., 2004; SARIFAKIOGLU et al., 2007; BUENO et
23 al., 2009; ATAÍDES et al., 2011). Nossos resultados indicam que os dermatófitos
24 apresentaram menor resposta *in vitro* frente ao fluconazol, apresentando uma grande
25 variação entre as CIMs encontradas, bem como altos valores tanto da CIM₅₀ quanto da
26 CIM₉₀. Resultados semelhantes foram mostrado por FERNÁNDEZ-TORRES et al.
27 (2001), BARROS et al. (2007), NWEZE et al. (2007) e BUENO et al. (2009). SANTOS
28 e HAMDAN (2007) mostraram que *T. rubrum* exibindo resistência a fluconazol
29 apresentaram CIMs baixas para cetoconazol, terbinafina, itraconazol e griseofulvina.
30 Por outro lado, SARIFAKIOGLU et al. (2007) mostraram que, embora o fluconazol
31 tenha apresentado a menor atividade *in vitro* contra dermatófitos, quando comparado
32 com os outros antifúngicos testados, a variação das CIMs, CIM₅₀ e CIM₉₀ foram baixas
33 em relação aos nossos resultados.

1 Neste trabalho nós mostramos que a griseofulvina apresentou também
2 grande variação nos valores das CIMs. NWEZE et al. (2007) também verificaram alta
3 taxa de variação e CIMs elevadas para griseofulvina, a qual, juntamente com o
4 fluconazol apresentou baixa atividade contra dermatófitos. CHADEGANIPOUR et al.
5 (2004), por sua vez, identificaram 3 amostras resistentes à griseofulvina. Este
6 antifúngico foi durante muito tempo a principal droga administrada para tratar
7 dermatofitoses. É considerada a droga de escolha no tratamento de *tinea capitis*,
8 entretanto, tem menor eficácia que os antifúngicos mais novos e está sendo
9 progressivamente substituída por essas novas drogas. Além disto, este fármaco adere-se
10 pobremente à queratina e existe a preocupação quanto à sua toxicidade e ao aumento de
11 resistência (HUANG et al., 2004; NWEZE et al., 2007; GUPTA e COOPER, 2008;
12 LEMSADDEK, 2008).

13 Dermatófitos constituem um grupo distinto dentre os fungos filamentosos.
14 Atualmente, o CLSI busca padronizar os testes de suscetibilidade destes fungos aos
15 compostos antifúngicos bem como definir pontos de corte que permitam classificá-los
16 em resistentes ou sensíveis. Entretanto, os pontos de corte não são estabelecidos e
17 fatores como tempo de incubação, ainda não estão bem definidos para a realização
18 destes testes.

19 Os resultados dos testes de suscetibilidade de FFND a agentes antifúngicos
20 mostraram baixa suscetibilidade aos antifúngicos avaliados. De forma geral, a CIM₅₀ e
21 CIM₉₀ foram altas para todos os FFND, além disso, a variação das CIMs encontrada foi
22 alta. Resultados semelhantes foram relatados por outros autores (McGINNIS e
23 PASARELL, 1998; BUENO et al., 2009; ATAÍDES et al., 2010). Dentre os FFND,
24 fungos do gênero *Fusarium* apresentaram os maiores valores de CIM *in vitro* e isto
25 também está de acordo com vários trabalhos publicados. Apesar da baixa resposta aos
26 antifúngicos, o voriconazol foi o agente mais potente contra *Fusarium* spp. Dados
27 semelhantes aos nossos foram encontrados nos estudos de McGINNIS E PASARELL
28 (1998), ALASTRUEY-IZQUIERDO et al. (2008), CÓRDOBA et al. (2008) e BUENO
29 et al. (2009), os quais mostraram que a terbinafina e os azóis não apresentaram atividade
30 contra *Fusarium* spp. e que umas das melhores atividades contra estes fungos foi
31 verificada com o voriconazol. *Fusarium* spp. são uns dos fungos mais resistentes aos
32 medicamentos disponíveis (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2008), entretanto, é
33 fundamental tratar infecções dermatológicas causadas por estes fungos para prevenir a

1 progressão para uma infecção disseminada, a qual exige debridamento cirúrgico e,
2 muitas vezes, terapia sistêmica (DIGNANI e ANAISSIE, 2004).

3 A habilidade de produzir enzimas hidrolíticas (exoenzimas) é considerada
4 um importante fator para a patogenicidade de leveduras (RÖRIG et al., 2009; TAY et
5 al., 2011). Nosso trabalho mostrou que 29,8% das leveduras do gênero *Candida* foram
6 produtoras de fosfolipases e 42,3% foram produtoras de proteinases. Um estudo
7 realizado em 2008 por MOHANDAS e BALLAL com *Candida* isoladas do sangue
8 mostrou que 74,6% foram produtoras de fosfolipases e 44,7% produtoras de
9 proteinases.

10 Analisando-se os isolados de *C. albicans* identificadas em nosso estudo,
11 verificamos que 88,9% foram produtoras de fosfolipases e 33,3% produtoras de
12 proteinases e, todas as produtoras de proteinases foram simultaneamente capazes de
13 produzir fosfolipases. RÖRIG et al., (2009) e KANTARCIOGLU e YÜCEL (2002),
14 avaliando *Candida* spp. isoladas de diferentes locais (cavidade oral, trato respiratório e
15 urogenital, sangue), mostraram resultados semelhantes aos nossos com relação à
16 produção de fosfolipases por *C.albicans* (83,8% e 93,3%, respectivamente). Todavia, os
17 resultados da produção de proteinases por essas leveduras foram distintos, pois todas as
18 amostras de *C. albicans* analisadas foram produtoras de proteinases no primeiro estudo
19 e 95% foram capazes de produzir esta enzima no segundo estudo. Por outro lado,
20 resultados de MOHANDAS e BALLAL (2008), com *Candida* isoladas de candidemias,
21 e COSTA et al. (2010), com *Candida* da cavidade oral, cateter e sangue, mostraram
22 porcentagens menores de *C. albicans* produtoras de fosfolipases (48,6% e 55,9%,
23 respectivamente).

24 Dentre as espécies de *C. não-albicans*, 24,2% foram produtoras de
25 fosfolipases e outros trabalhos mostraram que este grupo tem produção enzimática
26 variável. Desta forma, 37,7% dos isolados de *C. não-albicans* da cavidade oral, cateter e
27 sangue (COSTA et al., 2010), 7,7% daquelas isoladas de candidemia (TAY et al, 2011)
28 e 42,8% também isoladas de candidemia (MOHANDAS e BALLAL, 2008) foram
29 produtoras de fosfolipases. Nossos resultados mostraram que, dentre *C. não-albicans*, *C.*
30 *parapsilosis* apresentou o maior número de amostras produtoras de proteinases (50%).
31 DAGDEVIREN et al. (2005), avaliando a atividade enzimática destas leveduras,
32 encontraram porcentagem um pouco menor que a nossa, já que 42.4% das *C.*
33 *parapsilosis* foram capazes de produzir esta enzima. Com relação à produção de
34 fosfolipases, 58,8% de *C. tropicalis* apresentaram atividade positiva para a enzima,

1 sendo esta a principal espécie de *C. não-albicans* com atividade para fosfolipases
2 (43,48%). Resultados distintos dos nossos foram observados por GALÁN-LADERO et
3 al. (2010) que encontraram baixa atividade de fosfolipases em *C. tropicalis* após 72
4 horas de incubação (20,7%) enquanto que todas elas foram produtoras de proteinases.

5 A produção de exoenzimas tanto por *C. albicans* como por *C. não-albicans*
6 tem sido demonstrada em vários estudos recentes (COSTA et al., 2010; GALÁN-
7 LADERO et al., 2010; SACRISTÁN et al., 2011, TAY et al., 2011). A ausência ou
8 baixa expressão destas enzimas podem indicar menor virulência natural de espécies de
9 *Candida* quando comparadas às espécies com alta expressão (MOHANDAS e
10 BALLAL, 2008). A produção de proteinases e fosfolipases pode variar de acordo com
11 tipo, local e estágio da lesão (MOHANDAS e BALLAL, 2011) e estudos sugerem que a
12 patogenicidade de *Candida* spp. pode estar relacionada com o local de infecção
13 (COSTA et al., 2010; SACRISTÁN et al., 2011). Contudo, nossos resultados não nos
14 permitiram relacionar o local de infecção com a produção dessas exoenzimas, sugerindo
15 que, a expressão de outros fatores de virulência pode estar associada à capacidade destas
16 leveduras causarem infecções dermatológicas.

17 Em nosso trabalho foi encontrado alto percentual de leveduras do gênero
18 *Trichosporon* produtoras de fosfolipases (66,67%) e baixa de produtoras de proteinases
19 (16,67%). BENTUBO (2008) observou menor percentual de amostras produtoras de
20 fosfolipases (57,1%) e maior percentual de produtoras de proteinases (46,4%) que nós.
21 Este autor sugere que as fosfolipases sejam uma das principais enzimas produzidas por
22 *Trichosporon* spp. Nosso estudo também verificou que estas leveduras produziram mais
23 fosfolipases do que proteinases embora o número de amostras avaliadas tenha sido
24 pequeno (12). Muitos trabalhos, atualmente, avaliam a produção de exoenzimas em
25 *Candida* spp. Entretanto, poucos trabalhos analisam a atividade destas enzimas em
26 *Trichosporon* spp. e isto dificulta a comparação dos resultados obtidos em nosso
27 trabalho.

28

29

30

31

32

33

34

1 7 CONCLUSÕES

2

3

4 As dermatomicoses foram mais frequentes em mulheres (60,6%) e
5 ocorreram principalmente em adultos com idade entre 31 e 60 anos (52,7%). O tipo de
6 infecção mais comum foi a onicomicose, sendo que 76,3% delas ocorreram nas unhas
7 dos pés.

8 Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas em 48,1% das amostras
9 analisadas e a *C. parapsilosis* foi a principal espécie encontrada. *T. rubrum*, por sua vez,
10 foi a espécie de dermatófito mais frequentemente isolada (52,8%) e dentre os FFND,
11 *Fusarium* spp. foram os mais encontrados (50%).

12 A maioria das leveduras analisadas mostrou-se sensível aos antifúngicos
13 testados, embora suscetibilidade dose-dependente tenha sido verificada, principalmente
14 ao itraconazol. Dermatófitos apresentaram padrões distintos de suscetibilidade aos
15 antifúngicos avaliados, sendo a terbinafina o composto mais ativo contra estes fungos.
16 FFND apresentaram altos valores de CIM para todos os compostos testados. Os
17 resultados dos testes de sensibilidade a antifúngicos revelaram que fungos isolados de
18 dermatomicoses respondem *in vitro* de forma diferente aos antifúngicos, de acordo com
19 cada grupo de fungo e dentre as diferentes espécies de um mesmo grupo.

20 Fosfolipases e proteinases foram predominantemente produzidas por
21 *Candida* spp. e, embora *C. albicans* tenha sido a maior produtora de fosfolipases, as
22 espécies de *C. não-albicans* foram as principais produtoras de proteinases. Entretanto,
23 nossos resultados não mostraram correlação entre a origem clínica dos isolados e sua
24 capacidade de produzir as exoenzimas.

25 Este é o primeiro trabalho que avalia a ocorrência de dermatomicoses na
26 cidade de Uberaba e região. Nossos dados confirmam que a distribuição de espécies de
27 fungos associados às dermatomicoses pode alterar de acordo com as diferenças
28 regionais. Os resultados deste trabalho ainda sugerem que a identificação dos fungos,
29 juntamente com a realização de testes de suscetibilidade aos antifúngicos são
30 procedimentos que poderiam contribuir para o sucesso da terapia dessas infecções.

31

32

REFERÊNCIAS

Abaci O. Investigation of extracellular phospholipase and proteinase activities of *Candida* species isolated from individuals denture wearers and genotypic distribution of *Candida albicans* strains. *Cur Microbiol.* 2011;62:1308-1314.

Abanmi A, Bakheshwain S, El Khizzi N, Zouman AR, Hantirah S, Al Harthi F, Al Jamal M, Rizvi SS, Ahmad M, Tariq M. Characteristics of superficial fungal infections in the Riyadh region of Saudi Arabia. *Int J Dermatol.* 2008;47:229–235.

Achterman RR, White TC. Dermatophyte virulence factors: identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. *Int J Microbiol.* 2012; doi:10.1155/2012/358305.

Adeleke SI, Usman B, Ihesiulor G. Dermatophytosis among itinerant quranic scholars in Kano (Northwest) Nigeria. *Nigerian Med Practitioner.* 2008;53(8):33-35.

Akcaglar S, Ener B, Toker SC, Ediz B, Tunali S, Tore O. A comparative study of dermatophyte infections in Bursa, Turkey. *Med Mycol.* 2011 Aug;49:602–607.

Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. Isolates identified by molecular methods. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:805–809.

Almeida LMM de, Souza EA de F, Bianchin DB, Svidzinski TIE. Resposta *in vitro* de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. In: *Anais Brasileiros de Dermatologia.* Rio de Janeiro: 2009;84(03):249- 255.

Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clin Dermatol.* 2010;28:197–201.

Anderson JB. Evolution of antifungal drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Jul;3(7):547-556

Aoki S, Ito-Kuwa, S, Nakamura, Y, Masuhara, T. Comparative pathogenicity of wild type strains and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. *Zentralbl Bakteriol*. 1990 Aug;273(3):332-43.

Araújo AJG de, Bastos OMP, Souza MAJ, Oliveira JC de. Onicomicoses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. *An Bras Dermatol*. 2003 Jul-Aug;78(4):445-455.

Araújo CR, Miranda KC, Fernandes O de FL, Soares AJ, Silva MRR. *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2009 Jan-Feb;50(1):9-12.

Ataídes FS, Chaul MH, El Essal FE, Costa CR, Souza LKH, Fernandes OFL, Silva MRR. Antifungal susceptibility patterns of yeasts and filamentous fungi isolated from nail infection. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;1:0-0. doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04315.x

Ataídes FS. Isolamento, identificação e suscetibilidade *in vitro* de fungos causadores de onicomicose. [dissertação na Internet]. Goiânia: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública UFG; 2010 [acesso em 12 jan. 2012]. 80p. Disponível em: http://www.iptsp.ufg.br/uploads/59/original_DissertacaoFabioSilvestre-2010.pdf

Ates A, Ozcan K., Ilkit M. Diagnostic value of morphological, physiological and biochemical tests in distinguishing *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes* complex. *Med Mycol*. 2008 Dec;46:811-822.

Barros MES, Santos PA, Hamdan JS. Evaluation of susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). *J Med Microbiol*. 2007;56:514-518.

Bentubo HDL. Leveduras do gênero *Trichosporon*: aspectos ecológicos, caracterização laboratorial, fatores associados à virulência e suscetibilidade à antifúngicos. [dissertação na Internet]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da USP; 2008 [acesso em 16 jan. 2012]. 140p. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-24112008-132327/>

Brajac I, Prpic-Massari L, Stojnic-Sosa L, Gruber F. Dermatomycoses in the Rijeka area, Croatia, before, during and after the war 1990–1999. *Mycoses*;46:213–217.

Brilhante RSN, Paixão GC, Salvino LK, Diógenes MJ, Bandeira SP, Rocha MFG. Epidemiologia e ecologia das dermatofitoses na cidade de Fortaleza: o *Trichophyton tonsurans* como importante patógeno emergente da *Tinea capitis*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000 Set-Out;33(5):417-425.

Bueno JG, Martinez C, Zapata B, Sanclemente G, Gallego M, Mesa AC. *In vitro* activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. *Clin Exp Dermatol*. 2009;35:658–663.

Calado NB. Frequência e etiologia das dermatomicoses em pacientes atendidos no Hospital Giselda Trigueiro, Natal / RN. [dissertação na Internet]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2005 [acesso em 12 jan. 2012]. 94p. Disponível em: http://bdtd.bczm.ufrn.br/tesesimplificado/tde_arquivos/23/TDE-2007-07-02T040932Z740/Publico/NicaciaBC.pdf

Campanha AM, Tasca RS, Svidzinski TIE. Dermatomicoses: frequência, diagnóstico laboratorial e adesão de pacientes ao tratamento em um sistema público de saúde, Maringá-PR, Brasil. *Latin Am J Pharmacy*. 2007;26(3):442- 448.

Carrillo-Muñoz AJ, Guillermo Quindós GQ, Cárdenes CD, Vargas RA, Arévalo P, Brió S, Madariaga L. Evaluación del medio *Chromalbicans* Agar para la identificación presuntiva de *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 2001;18:105-108.

Carrillo-Munõz AJ, Tur-Tur C, Hernández-Molina JM, Santos P, Cárdenes D, Giusiano G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de lãs micosis ungueales. *Rev Iberoam Micol*. 2010;27(2):49–56.

Casasa AR de, Herreraa A, Suárezb AI, Camachoa FM. Infección cutánea por *Fusarium* en paciente inmunocompetente. *Actas Dermosifiliogr*. 2006;97(4):278-80.

Cetinkaya Z, Kiraz N, Karaca S, Kulac M, Ciftci IH, Aktepe OC, Altindis M, Kiyildi N, Piyade M. Antifungal susceptibilities of dermatophytic agents isolated from clinical specimens. *Eur J Dermatol*. 2005;15(4):258-261.

Chadeganipour M, Nilipour S, Havaei A. *In vitro* evaluation of griseofulvin against clinical isolates of dermatophytes from Isfahan. *Mycoses*. 2004;47:503–507.

Chagas-Neto TC, Chaves GM, Colombo AL. Update on the Genus *Trichosporon*. *Mycopathologia*. 2008;166:121–132.

Charles AJ. Superficial cutaneous fungal infections in tropical countries. *Dermatol Ther*. 2009;22:550–559.

Chen SCA, Sorrel TC. Antifungal agents. *Med J Australian*. 2007;187:404–409.

Chinelli PAV, Sofiatti A de A, Nunes SRS, Martins JE da C. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2003 Sep-Oct;45(5):259-263.

Choappa RC, Ponce EE, Calderón LR, Delgado NV, Vieille PO, Piontelli EL. Micosis superficiales en la ciudad de Valparaíso, Chile. Período 2007-2009. *Rev Chil Infect*. 2011;28(5):404-409.

Christensen WB. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J Bacteriol*. 1946;52:461-6.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute [Internet]. Wayne [atualizado em 2012; acesso em 21 mar. 2012]. Disponível em:

http://www.clsi.org/source/orders/categories.cfm?section=Antifungal_Susceptibility_Testing&CAT=ANTIFUNGAL

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for both dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. CLSI document M38-A2. Wayne PA. 2008;28(16):52p.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for both dilution antifungal susceptibility testing of yeast. CLSI document M27-A3. Wayne PA. 2008;28(14):40p.

Coelho LM, Ferreira RA, Maffei CML, Rossil NMM. *In vitro* antifungal drug susceptibilities of dermatophytes microconidia and arthroconidia. J Antimicrobial Chemoth. 2008 Oct;62:758-761.

Cooke VM, Miles RJ, Prince RG, Midgley G, Khamri W, Richardson AC. New Chromogenic Agar Medium for the identification of *Candida* spp. Appl Environmental Microbiol. 2002 Jul;68(7):3622-3627.

Córdoba S, Rodero L, Vivit W, Abrantes R, Davel G, Vitale RG. *In vitro* interactions of antifungal agents against clinical isolates of *Fusarium* spp. Int J Antimicrobial agents. 2008; 31:171-174

Costa CR, Passos XS, Hashimoto e Souza LK, Lucena P de A, Fernandes O de FL, Silva MRR. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheter, blood and oral cavity. Rev Inst Med Trop. 2010 May-Jun;52(3):139-143.

Costa CR. Fatores de virulência de isolados de *Candida* de pacientes imunocomprometidos: Caracterização molecular de *candida albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol. [tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2009.

Costa M, Passos XS, Souza LKH, Miranda ATB, Lemos J de A, Júnior JG de O, Silva MRR. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35(1):19-22.

Cursi IB, Freitas LB da CR de, Neves M de LPF, Silva IC da, Orofino-Costa R. Onycomychois due to *Scytalidium* spp.: a clinical and epidemiologic study at a University Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. An Bras Dermatol. 2011;86(4):689-93.

Dagdeviren M, Cerikcioglu N, Karavus M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalized patients. Mycoses. 2005;48:321–326.

Dalmau LM. Observation on mycological technique with particular references to pathogenic fungi. Puerto Rico J Publ Health Trop Med. 1929;5:302-311.

Das S, Goyal R e Bhattacharya SN. Laboratory-based epidemiological study of superficial fungal infections. J Dermatol. 2007;34:248–253.

De Hoog GS, Attili-Angeli D, Vicente VA, Van Den Ende AHGG, Queiroz-Telles F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. Med Mycol. 2004 Oct;42:405-416.

Degreef H. Clinical Forms of Dermatophytosis (Ringworm Infection). Mycopathologia. 2008;166:257–265.

Dignani MC, Anaissie E. Human fusariosis. Clin Microbiol Infect. 2004 Mar;10 Suppl 1:67-75.

Drakensjö IT, Chryssanthou E. Epidemiology of dermatophyte infections in Stockholm, Sweden: a retrospective study from 2005–2009. Med Mycol. 2011;49:484-488.

Dubois D, Pihet M, Le Clec'h C, Croue' A, Beguin H, Bouchara JP, Chabasse D. Cutaneous phaeohyphomycosis due to *Alternaria infectoria*. Mycopathologia. 2005;160:117–123.

Elewski BE. Onychomycosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Management. Clin Micro Rev. 1998, 11(3): 415-429.

Escobar ML, Carmona-Fonseca J. Onicomycosis por hongos ambientales no dermatofíticos. Rev Iberoam Micol. 2003;20:6-10.

Espinel-Ingroff A, Boyle K, Sheehan DJ. *In vitro* antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: Review of the literature. Mycopathologia. 2001;150:101–115.

Fernandes NC, Akiti T, Barreiros MGC. Dermatophytoses in children: study of 137 cases. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2001;43(2):83-85.

Fernández-Torres B, Inza I, Guarro J. *In vitro* activities of the new antifungal drug eberconazole and three other topical agents against 200 Strains of Dermatophytes. J Clin Microb. 2003 Nov;41(11):5209–5211.

Frias DRF, Kozusny-Andreani DI. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto sobre *Trichophyton mentagrophytes*. Rev Bras Plantas Mediciniais. 2009;11(2):216-220.

Galán-Ladero MA, Blanco MT, Sacristán B, Fernández-Calderón MC, Pérez-Giraldo C, Gómez-García AC. Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. Med Mycol. 2010 Feb;48:207–210.

Garmendia JL, Viedma PI, Arza JM. Onicomycosis: diagnóstico y tratamiento. Inf Ter Sist Nac Salud. 2008, 32(3): 83-92

Ge YP, Boekhout T, Zhan P, Lu GX, Shen YN, Li M, Shao HF, Liu WD. Characterization of the *Candida parapsilosis* complex in East China: species distribution differs among cities. *Med Mycol*. 2012 Jan;l 50:56-66.

Georg LK, Camp LB. Routine nutritional tests for the identification of dermatophytes. *J Bacteriol*. 1957;74:113-121.

Ghannoum MA, Isham N, Sheehan D. Voriconazole susceptibilities of dermatophyte isolates obtained from a worldwide *Tinea capitis* Clinical Trial. *J Clin Microbiol*. 2006 Jun;44(7):2579–2580.

Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clin Microbiol. Rev*. 1999;12(4):501.

Godoy-Martinez P, Nunes FG, Tomimori-Yamashita J, Urrutia M, Zaror L, Silva V, Fischman O. Onychomycosis in São Paulo, Brazil. *Mycopathologia*. 2009;168:111–116.

Groll AH, Kolve H. Antifungal Agents: *In Vitro* Susceptibility Testing, Pharmacodynamics, and Prospects for Combination Therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23:256–270.

Guého E, Smith MT, De Hoog GS, Billon-Grand G, Christen R, Batenburg-Van Der Vegte WH. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1992 May;61(4):289-316.

Gugnani HC. Nondermatophytic filamentous keratinophilic fungi and their role in human infection. *Rev Iberoam Micol*. 2000;27: 109-114.

Guilhermetti E, Takahachi G, Shinobu CS, Svidzinski TIE. *Fusarium* spp. as agents of onychomycosis in immunocompetent hosts. *Int J Dermatol*. 2007;46:822–826.

Guinea J, Recio S, Escribano P, Peláez T, Gama B, Bouza E. *In Vitro* Antifungal Activities of Isavuconazole and Comparators against Rare Yeast Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Sep;54(9):4012–4014.

Gupta AK, Cooper EA. Update in antifungal therapy of dermatophytoses. *Mycopathologia*. 2008;166:353-367.

Gupta AK, Tu LQ. Dermatophytes: Diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54:1050-1055.

Gupta AK, Kohli Y, Batra R. *In vitro* activities of posaconazole, ravuconazole, terbinafine, itraconazole and fluconazole against dermatophyte, yeast and non-dermatophyte species. *Med Mycol*. 2005 Mar;43:179-185.

Gupta AK, Baran R, Summerbell RC. *Fusarium* infections of the skin. *Curr Opin Infect Dis*. 2000 Apr;13(2):121-128.

Gupte M, Kulkarni P, Ganguli BN. Antifungal antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002;58:46–57.

Hashemi SJ, Gerami M, Zibafar E, Daei M, Moazeni M, Nasrollahi A. Onychomycosis in Tehran: mycological study of 504 patients. *Mycoses*. 2009;53:251–255.

Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008;51(Suppl. 4):2–15.

Hernández-Salazar A, Carbajal-Pruneda P, Martinez RF, Arenas R. Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) em um servicio de dermatologia de un hospital general de La Ciudad de México. *Rev Iberoam Micol*. 2007;24:122-124.

Huang DB, Ostrosky-Zeichner L, Wu JJ, Pang KR, Tyring SK. Therapy of common superficial fungal infections. *Dermatol Ther*. 2004;17:517–522.

Jayatilake JAMS, Tilakaratne WM, Panagoda GJ. Candidal onychomycosis: a mini review. *Mycopathologia*. 2009;168:165-173.

Jessup CJ, Ryder NS, Ghannoum MA. An evaluation of the *in vitro* activity of terbinafine. *Med Mycol*. 2000;38:155–159.

Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clin Inf Dis*. 2008;46:120–8.

Kantarcioğlu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. 2002 Jun;45(5-6):160-5.

Koksal F, Er E, Samati M. Causative Agents of Superficial Mycoses in Istanbul, Turkey: Retrospective Study. *Mycopathologia*. 2009;169:117–123.

Komiyama E, Santos SSF, Jorge AOC, Martins CAP, Koga-Ito CY. Produção de exoenzimas por amostras de *Candida albicans* isoladas de pacientes com periodontite crônica e indivíduos-controle. *Rev de Odont da Universidade da Cidade de São Paulo*. 2007 set-dez;19(3):288-92.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Jr WCW. Diagnóstico microbiológico-texto e atlas colorido. 5ªed. São Paulo: Editora Médica e Científica Ltda. 2001; 1565p.

Koussidou-Eremondi T, Devliotou-Panagiotidou D, Mourellou-Tsatsou O, Minas A. Epidemiology of dermatomycoses in children living in Northern Greece 1996–2000. *Mycoses*. 2005;48:11–16.

Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeasts - A Taxonomic Study*. 4^o ed. Elsevier Science; 1998; 1055p.

Lacaz CS, Pereira AD, Heins-Vaccari EM, Cucé LC, Benatti C, Nunes RS, Melo NT de, Freitas-Leite RS de, Hernández-Arriagada GL. Onychomycosis caused by *Scytalidium dimidiatum*. report of two cases. Review of the taxonomy of the synanamorph and anamorph forms of this coelomycete. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1999 Sep-Oct;41(5):319-323.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Vaccari EMH, Melo NT. *Tratado de micologia médica*. 9.^a ed. São Paulo: Sarvier; 2002; 1104p.

Lemsaddek A. Estudo de dermatófitos por métodos moleculares: identificação, resistência a antifúngicos e virulência. [tese na Internet]. Lisboa: Universidade de Lisboa; 2008 [acesso em 10 jan. 2012]. 218p. Disponível em: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/1636/1/19513_ulsd_re479_Tese.pdf

Li HM, Du HT, Liu W, Wan Z, Li RY. Microbiological characteristics of medically important *Trichosporon* species. *Mycopathologia*. 2005;160:217–225.

Lodder J, Kreger-Van-Rij NJW. *Characteristics and methods used in the classification. The Yeasts. A Taxonomic Study*, 1952.

Lopez-Martinez R, Manzano-Gayosso P, Hernandez-Hernandez F, Bazán-Mora E, Méndez-Tovar LJ. Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: an analysis of 2084 cases. *Med Mycol*. 2010;48(3):476 – 479.

Lupa S, Seneczko F, Jeske J, Głowacka A, Ochećka-Szymanska A. Epidemiology of dermatomycoses of humans in Central Poland. Part III. *Tinea pedis*. *Mycoses*. 1999;42(9-10):563–565.

Magalhães AR, Mondino SSB de, Silva M da, Nishikawa MM. Morphological and biochemical characterization of the aetiological agents of white piedra. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [online]. 2008;103(8):786-790.

Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Arenas R, Hernández-Hernández F, Millán-Chiu B, Torres-Rodríguez JM, Cortés-González E, Fernández R, López-Martínez R. Levaduras causantes de onicomicosis en cuatro centros dermatológicos mexicanos y su sensibilidad antifúngica a compuestos azólicos. *Rev Iberoam Micol.* 2011;28(1):32–35.

Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A. Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. *Mycopathologia.* 2008;166:369–383.

Martins EA, Guerrer LV, Cunha KC, Soares MMCN, Almeida MTG de. Onicomicose: estudo clínico, epidemiológico e micológico no município de São José do Rio Preto. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007 Set-Out;40(5):596-598.

McGinnis MR, Pasarell L. *In vitro* evaluation of terbinafine and itraconazole against dematiaceous fungi. *Med Mycol.* 1998;36:243–246 (Short communication).

Melo AS, Bizerra FC, Müller EF, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol.* 2011; Apr;49:253-262.

Mohandas V, Ballal M. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: Biofilm formation, proteinase and phospholipase production: A study on hospitalized patients in Southern India. *J Glob Infect Dis.* 2011;3:4-8.

Mohandas V, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol.* 2008; 25:208-210.

Moutran R, Maatouk I, Wehbé J, Abadjian G, Obeid G. Subcutaneous infection spread by *Scytalidium (Neoscytalidium) dimidiatum*. *Ann Dermatol Venereol.* 2012 Mar;139(3):204-8

Mukherjee PK, Steven D, Leidich SD, Nancy Isham NI, Leitner I, Ryder NS, Ghannoum MA. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Jan;47(1):82–86.

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landery ML, Pfaller MA. *Microbiologia Médica*. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004,776p.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003 Sep; 67:3400-4281.

Najafzadeh MJ, Sun J, Vicente VA, Klaassen CHW, Bonifaz A, Van Den Ende AHGG, Menken SBJ, de Hoog GS. Molecular Epidemiology of *Fonsecaea* Species. *Emerg Infect Dis.* 2011 Mar;17(3):464-469.

Nardin ME, Pelegri DG, Manias VG, Mendéz E de LA. Etiological agents of dermatomycoses isolated in a hospital of Santa Fé City, Argentina. *Rev Argent Microbiol*, 2006;38(1):25-27.

Navarini A. Avaliação de testes de identificação e sensibilidade que podem ser utilizados em laboratórios clínicos em cepas de *Candida* spp. [dissertação na Internet]. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2007. [acesso em 20 jan. 2012]. 55p. Disponível em: <http://www.fcmscsp.edu.br/posgraduacao/cursos/teses.php?ref=2>

Neji S, Makni F, Cheikhrouhou F, Sellami A, Sellami H, Marreckchi S, Turki H, Ayadi A. Epidemiology of dermatomycoses in Sfax, Tunisia. *Mycoses.* 2009;52:534–538.

Noumi E, Snoussi M, Hentati H, Mahdouani K, Del Castillo L, Valentin E, Sentandreu R, Bakhrouf A. Adhesive Properties and Hydrolytic Enzymes of Oral *Candida albicans* Strains. *Mycopathologia* 2010; 169:269–278.

NwezeEI, Ogonna CC, Okafor JI. *In Vitro* susceptibility testing of dermatophytes isolated from pediatric cases in Nigeria against five antifungals. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2007 Sep-Oct;49(5):293-295.

Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents:mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 2003 Jun;11(6): 272-279.

Paphitou NI, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH. *In Vitro* Antifungal Susceptibilities of *Trichosporon* Species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Apr;46(4):1144–1146.

Parada HLFRS. Prevalência de dermatomicoses nos membros inferiores em doentes diabéticos. Avaliação de possíveis factores predisponentes para a infecção. [dissertação na Internet]. Lisboa: Universidade de Lisboa, 2007 [acesso em 10 jan. 2012]. 206p. Disponível em: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/1291/1/19252_ulfc080494_tm.pdf

Pastor FJ, Guarro J. *Alternaria* infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features. *Clin Microbiol Inf.* 2008 Aug;14(8):734-746.

Pelegri A, Takahashi JP, Pereira CQM, Pessoni RB, Souza MC. Incidence of dermatophytosis in a public hospital of São Bernardo do Campo, São Paulo State, Brazil. *Rev Iberoam Micol.* 2009;26(2):118-120.

Pereiro Jr M, Ferreiro MMSP, De Hoog GS, Toribio J. Cutaneous infection caused by *Alternaria* in patients receiving tacrolimus. *Med Mycol;* 2004 Jun;42:277-282.

Pérez-González M, Torres-Rodríguez JM, Martínez-Roig A, Segura S, Griera G, Triviño L, Pasarín M. Prevalence of *tinea pedis*, *tinea unguium* of toenails and *tinea capitis* in school children from Barcelona. *Rev Iberoam Micol.* 2009;26(4):228–232.

Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida* (Torulopsis) *glabrata*. *J Clin Microbiol.* 1996 Jan;34(1):58-61.

Pontes ZBV, Lima E de O, Oliveira NMC, Santos JP, Ramos AL, Carvalho MFFP. Onicomycosis in Joao Pessoa city, Brazil. *Rev Argent Microbiol.* 2002 Apr-Jun;34(2):95-99.

Portela MB. Estudo de proteínas funcionais de *Candida* spp. isoladas da cavidade bucal de crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência adquirida. [tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2006.

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982;20:7-14.

Queiroz-Telles F, Esterre P, Perez-Blanco M, Vitale RG, Salgado CG, Bonifaz A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol*. 2009 Feb;47(Special Issue):3- 15.

Rambach G, Oberhauser H, Speth C, Lass-Flörl C. Susceptibility of *Candida* species and various moulds to antimycotic drugs: use of epidemiological cutoff values according to EUCAST and CLSI in an 8-year survey. *Med Mycol*. 2011 Nov;49:856–863.

Rezende C, Borsari GP, Silva ACF da, Cavalcanti FR. Estudo epidemiológico das dermatofitoses em instituições públicas da cidade de Barretos, São Paulo, Brasil. *Rev Bras Análises Clínicas*. 2008;40(1):13-16.

Ribeiro MA, Alastruey-Izquierdo A, Gomez-Lopez A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Molecular identification and susceptibility testing of *Trichosporon* isolates from a Brazilian hospital. *Rev Iberoam Micol*. 2008; 25:221-225.

Rodriguez-Tudela JL, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cano V, Tapia C, Perkins A, Gomez-Lopez A, Rodero L, Cuenca-Estrella M. Susceptibility Patterns and Molecular Identification of *Trichosporon* Species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Oct;49(10):4026–4034.

Romano C, Gianni C, Difonzo EM. Retrospective study of onychomycosis in Italy: 1985–2000. *Mycoses*. 2005;48:42–44.

- Röriq KCO, Colacite J, Abegg MA. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. Rev Soc Bras Med Trop. 2009 Mar-Apr;42(2):225-227.
- Rotta I; Cristina A, Rodrigues P, Fleith M, Correr CJ. Efficacy and safety of topical antifungals in the treatment of dermatomycosis: a systematic review. Brit J Dermatol. 2012 Jan 11. doi:; 10.1111/j.1365-2133.2012.10815.x. [Epub ahead of print]
- Ruiz-Herrera J; San-Blas G. Chitin synthesis as a target for antifungal drugs. Curr Drug Targets Infect Disord. 2003;3:77-91.
- Ryder NS, Wagner S, Leitner I. *In Vitro* Activities of Terbinafine against Cutaneous Isolates of *Candida albicans* and Other Pathogenic Yeasts. Antimicrob Agents Chemother. 1998 May; 42(5):1057–1061.
- Sacristán B, Blanco MT, Galán-Ladero MA, Blanco J, Pérez-Giraldo C, Gómez-García AC. Aspartyl proteinase, phospholipase, hemolytic activities and biofilm production of *Candida albicans* isolated from bronchial aspirates of ICU patients. Med Mycol; 2011 Jan;49:94–97.
- Santos DA, Hamdan JS. *In vitro* activities of four antifungal drugs against *Trichophyton rubrum* isolates exhibiting resistance to fluconazole. Mycoses. 2007;50:286–289.
- Santos DA, Hamdan JS. Evaluation of Broth Microdilution Antifungal Susceptibility Testing Conditions for *Trichophyton rubrum*. J Clin Microbiol. 2005 Apr;43(4):1917–1920.
- Santos JI dos; Coelho MPP, Nappi BP. Diagnóstico laboratorial das dermatofitoses. Rev Bras Análises Clínicas. 2002;34(1):03-06.
- Sarifakioglu E, Sec Kin D, Demirbilek M, Can F. *In vitro* antifungal susceptibility patterns of dermatophyte strains causing *tinea unguium*. Clin Exp Dermatol. 2007;32: 675–679.

Schaller M, Borelli C, Berger U, Walker B, Schmidt S, Weindl G, Jäckel A. Susceptibility testing of amoroline, bifonazole and ciclopiroxolamine against *Trichophyton rubrum* in an *in vitro* model of dermatophyte nail infection. *Med Mycol.* 2009 Nov;47:753–758.

Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the Epidemiology of Dermatophyte Infections. *Mycopathologia.* 2008;166:335–352.

Segner S, Jouret F, Durant JF, Marot L, Kanaan N. Cutaneous infection by *Alternaria infectoria* in a renal transplant patient. *Transpl Infect Dis.* 2009;11:330-332.

Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia Médica - À luz de autores contemporâneos*, 2ª Ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004;388p.

Silva JO, Costa PP, Reche SHC. Manutenção de leveduras por congelamento a – 20°C. *Rev Bras Anal Clin.* 2008, 40 (1): 73-74.

Simonnet C, Berger F, Gantier JC. Epidemiology of superficial fungal diseases in French Guiana: a three-year retrospective analysis. *Med Mycol.* 2011 Aug;49:608–611.

Souza LKH, Fernandes OFR, Passos XS, Costa CR, Lemos JA, Silva MRR. Epidemiological and mycological data of onychomycosis in Goiania, Brazil. *Mycoses.* 2009;53:68-71.

Taj-Aldeen SJ, Al-Ansari N, El Shafei S, Meis JF, Curfs-Breuker I, Theelen B, Boekhout T. Molecular identification and susceptibility of *Trichosporon* species isolated from specimens in Qatar: Isolation of *Trichosporon dohaense* Taj-Aldeen, Meis & Boekhout sp. nov. *J Clin Microbiol.* 2009 June;47(6):1791–1799.

Tamura NK, Negri MFN, Bonassoli LA, Svidzinski TIE. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007, jan-fev;40(1):91-93.

Tatsumi Y, Yokoo M, Senda H, Kakehi K. Therapeutic Efficacy of Topically Applied KP-103 against Experimental *Tinea unguium* in Guinea Pigs in Comparison with Amorolfine and Terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Dec;46(12):3797–3801.

Tay ST, Abidin IAZ, Hassan H, NG KP. Proteinase, phospholipase, biofilm forming abilities and antifungal susceptibilities of Malaysian *Candida* isolates from blood cultures. *Med Mycol*. 2011 Jul;49:556-560.

Thompson GR, Cadena J, Patterson TF. Overview of Antifungal Agents. *Clin Chest*. 2009;30:203–215.

Thompson III GR, Wiederhold NP, Sutton DA, Fothergill A, Patterson TF. *In vitro* activity of isavuconazole against *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, *Saccharomyces* and *Pichia* species. *J Ant Chemot*. 2009;64:79–83.

Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 4^a ed. São Paulo: Atheneu; 2005; 586p.

Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, na emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Ver*. 2008 Oct;21(4):606-625.

Tsoumani M, Jelastopulu E, Bartzavali C, Vamvakopoulou S, Dimitracopoulos G, Anastassiou ED, Christofidou M. Changes of Dermatophytoses in Southwestern Greece: An 18-Year Survey. *Mycopathologia* 2011 Feb. [epud ahead of print].

Xavier APM, Oliveira JC de, Ribeiro VL da S, Souza MAJ. Epidemiological aspects of patients with unguis and cutaneous lesions caused by *Scytalidium spp*. *An Bras Dermatol*. 2010;85(6):805-10.

Weitzman L, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(2):240–259.

Welsh O, Vera-Cabrera L, Welsh E. Onychomycosis. Clin Dermatol. 2010;28:151–159.

Wickerham, LJ. The taxonomy of yeasts. US Department of Agriculture Technical Bulletin, n. 1029, 1951.

Wille MP, Arantes TD, Silva JLM. Epidemiologia das dermatomicoses em população da periferia de Araraquara-SP. Rev Bras Clin Med. 2009 (7):295-298

Woodfolk JA. Allergy and Dermatophytes. Clin Microbiol Rev. 2005 Jan; 18(1):30–43.

Zepelin MBV, Kunz L, Rvchel R, Ruchard V, Weig M, GroB V. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. J Antimicrob Chemother. 2007;60:424-429.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba(MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP
Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação da atividade antifúngica de extratos vegetais de *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass contra dermatófitos
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Anderson Assunção Andrade
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 14/04/2009
PROTOCOLO CEP/UFTM: 1361

O pesquisador responsável receberá apenas o salário de professor adjunto pago pela instituição, não sendo requerida remuneração extra para a realização desta pesquisa.

13. ADEQUAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO E FORMA DE OBTÊ-LO

O Termo está claro e será obtido pelo pesquisador responsável.

14. ESTRUTURA DO PROTOCOLO – O protocolo foi adequado para atender às determinações da Resolução CNS 196/96.

15. COMENTÁRIOS DO RELATOR, FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E COMPLEMENTARES

PARECER DO CEP: APROVADO

(O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início do processo).

DATA DA REUNIÃO: 05-02-2010

Prof.^a Ana Palmira Soares dos Santos
Coordenadora



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Disciplina de Microbiologia

Praça Manoel Terra, 330 – Abadia - 38026-016 - (34) 3318-6480 – anderson.andrade@dcb.uftm.edu.br – UBERABA - MG

Mem. 88/2010/MICROBIOLOGIA/DCB/UFTM

Uberaba, 01 de Julho de 2010.

À Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM

Assunto: Extensão de projeto de pesquisa

Prezada profª Ana Palmira,

Vimos solicitar que o projeto intitulado “Identificação e avaliação do perfil de sensibilidade a antifúngicos de espécies de *Candida* spp. isoladas de onicomicoses”, seja incluído como extensão do projeto “Avaliação da atividade antifúngica de extratos vegetais de *Porophyllum ruderale* (jacq.) cass contra dermatófitos”, protocolo 1361.

A fim de atender aos objetivos propostos no projeto do protocolo 1361, isolamos fungos de lesões suspeitas de micoses cutâneas, com o principal foco de recuperar dermatófitos para posterior avaliação de seus perfis de susceptibilidade a antifúngicos e a extratos de *Porophyllum ruderale*. No entanto, dentre os pacientes com micoses cutâneas, observamos muitos casos de onicomicoses, dos quais foram isolados um número de *Candida* spp. quase tão grande quanto de dermatófitos. Esse fato nos motivou a propor o presente projeto. Entendemos que esse novo projeto pode ser enquadrado com extensão do anterior, visto que não serão feitas novas coletas de amostras de pacientes, apenas vamos identificar, até o nível de espécie, as *Candida* spp. já isoladas. Em seguida realizaremos os testes para determinar os perfis de susceptibilidade das mesmas a alguns antifúngicos comumente utilizados.

Colocamo-nos à disposição desse Comitê para quaisquer esclarecimentos adicionais.

Atenciosamente,


Prof. Anderson Assunção Andrade

Coordenador dos projetos

Recebi em 02/07/2010


Maria José Ferreira de Sousa
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM

Aprovada em
09/07/2010


Prof. Ana Palmira Soares dos Santos
Coordenadora do CEP da UFTM



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E NATURAIS
Disciplina de Microbiologia

Praça Manoel Terra, 330 – Abadia - 38025-015 - (34) 3318-5480 – andersona@icbn.uftm.edu.br – Uberaba - MG

Mem. 76/2011/MICROBIOLOGIA/ICBN/UFTM

Uberaba, 10 de Junho de 2011.

À Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM

Assunto: Extensão de projeto de pesquisa

Prezada Profª Ana Palmira,

Vimos solicitar que o projeto intitulado “Avaliação da distribuição, fatores de virulência e susceptibilidade a antifúngicos de isolados clínicos do complexo *Candida parapsilosis* em Uberaba - MG”, seja incluído como extensão do projeto “Avaliação da atividade antifúngica de extratos vegetais de *Porophyllum ruderale* (jacq.) cass contra dermatófitos”, protocolo 1361.

A fim de atender aos objetivos propostos no projeto do protocolo 1361, isolamos fungos de lesões suspeitas de micoses cutâneas, com o principal foco de recuperar dermatófitos para posterior avaliação de seus perfis de susceptibilidade a antifúngicos e a extratos de *Porophyllum ruderale*. No entanto, além de fungos dermatófitos, isolamos um grande número de leveduras fenotipicamente identificadas como *Candida parapsilosis*. Com base em estudos genéticos moleculares, recentemente essa espécie foi separada em três espécies distintas, intimamente relacionadas: *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis* e *C. parapsilosis* sensu stricto. Essas espécies formam o chamado complexo *Candida parapsilosis*. Considerando que as três espécies de leveduras desse complexo são fisiologicamente e morfológicamente indistinguíveis, mas podem variar quanto ao perfil de resistência aos antifúngicos, características de virulência, prevalência anatômica e geográfica, propusemos no projeto em questão avaliar a distribuição e características de virulência das espécies do complexo *Candida parapsilosis* em Uberaba. Tais

Aprovado em 10/06/2011

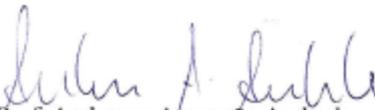
Profª Ana Palmira Soares dos Santos
Coordenadora do CEP da UFTM

conhecimentos são importantes para definir se a discriminação de rotina entre o complexo *C. parapsilosis* é necessária para os laboratórios clínicos. A constatação de diferenças importantes nas propriedades de virulência e susceptibilidade aos antifúngicos entre as espécies desse complexo podem certamente influenciar decisões terapêuticas.

Entendemos que esse novo projeto pode ser enquadrado com extensão do anterior, visto que não serão feitas novas coletas de amostras de pacientes, apenas vamos caracterizar espécies já isoladas e fenotipicamente identificadas como *Candida parapsilosis*.

Colocamo-nos à disposição desse Comitê para quaisquer esclarecimentos adicionais.

Atenciosamente,



Prof. Anderson Assunção Andrade

Coordenador dos projetos