



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

GERMANA COSTA PAIXÃO

***Trichophyton tonsurans* PRODUTOR DE CLAMIDOCONÍDIOS: ANÁLISE
SOBRE A TAXONOMIA, PERFIL PROTEICO, FILOGENIA E
SENSIBILIDADE DE BIOFILMES**

FORTALEZA

2021

GERMANA COSTA PAIXÃO

***Trichophyton tonsurans* PRODUTOR DE CLAMIDOCONÍDIOS: ANÁLISE
SOBRE A TAXONOMIA, PERFIL PROTEICO, FILOGENIA E
SENSIBILIDADE DE BIOFILMES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal

Orientador: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim.
Coorientadora: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

P172t Paixão, Germana Costa Paixão.

Trichophyton tonsurans produtor de clamidoconídios: análise sobre a taxonomia, perfil proteico, filogenia e sensibilidade de biofilmes / Germana Costa Paixão Paixão. – 2021.
97 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim.

Coorientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

1. T. tonsurans. 2. clamidoconídios. 3. perfil proteico. 4. farnesol. 5. terbinafina. I. Título.

CDD 616.9

GERMANA COSTA PAIXÃO

***Trichophyton tonsurans* PRODUTOR DE CLAMIDOCONÍDIOS: ANÁLISE
SOBRE A TAXONOMIA, PERFIL PROTEICO, FILOGENIA E
SENSIBILIDADE DE BIOFILMES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Microbiologia Médica.

Área de concentração: Microbiologia Médica Humana e Animal.

Aprovada em: 01/07/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Julio Costa Sidrim (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Cláudia Maria Leal Beviláqua
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Maria de Fátima da Silva Teixeira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

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

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A vida me ensinou que uma das maiores virtudes do ser humano é a gratidão. Reconhecer meus limites me fez perceber que eu só conseguiria alcançar meus objetivos pessoais e profissionais por meio de trabalho coletivo. Até mesmo os projetos que me pareciam ser individuais somente puderam avançar quando várias pessoas se dispuseram a me auxiliar, orientar e me conduzir pelo melhor caminho. Chego nesse momento, aguardado há quase duas décadas, grata a muitas pessoas que me trouxeram luz e, mesmo percebendo minhas fragilidades, me fizeram gigante. *“...e agora penso que a estrada da vida tem ida e volta, ninguém foge do destino, esse trem que nos transporta.”* (Sete desejos/Alceu Valença).

À minha família, em especial., ao meu Pai, Milton Paixão Júnior, que nos deixou fisicamente há 13 anos, mas que permanece olhando e zelando por mim, diretamente da mais linda estrela do firmamento.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, com todo meu respeito e amor. Meus caminhos cruzaram com os dele na minha graduação, no longínquo ano de 1994. Ele foi o professor decisivo na minha formação e a quem devo todas as minhas maiores oportunidades e minha identidade profissional. Com ele participei do “nascimento” do CEMM e acompanhei os passos iniciais do Centro que viraria referência nacional. Foi meu orientador na graduação, no mestrado e agora, fechando o ciclo, no Doutorado. Minhas escolhas erradas e inexperientes colocaram um oceano entre nós, mas nenhuma distância, geográfica ou temporal., será capaz de diminuir minha gratidão, respeito, admiração, amor e honra em ser sua discípula e levar dentro de mim todos os seus ensinamentos microbiológicos e de vida, que me moldaram na profissional que eu sou. *“Um professor sempre afeta a eternidade. Ele nunca saberá onde sua influência termina”* –Henry Bropks Adams

A Profa. Dra. Sâmia Brilhante, por todos os ensinamentos sobre determinação, perseverança, fidelidade e amizade. Pelo acolhimento amoroso, que me fez retomar os estudos e chegar até aqui e por todos os momentos compartilhados em nossa vida privada. Pela gestão cuidadosa do CEMM, sempre provendo as condições necessárias para as pesquisas de seus orientandos e dos agregados. Pela abnegação em compartilhar comigo todo seu conhecimento e por sempre me lembrar quem eu sou, mesmo quando eu já não tinha mais certeza. A você Profa. Sâmia (e minha Samira), meu amor incondicional.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pela oportunidade rara de retornar ao começo. Pelas orientações amigáveis, pelo olhar, sempre cirúrgico, nos textos e artigos, pelo incentivo e compreensão dos meus limites.

Aos professores Drs. Claudia Maria Leal Beviláqua, Maria de Fátima da Silva Teixeira, Nilberto Robson Falcão do Nascimento e Rodrigo Silveira Vieira por aceitarem, gentilmente, fazer parte desta banca e terem doado seu tempo e conhecimento para tornar esse trabalho melhor.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, pela disponibilidade na realização da análise proteica das amostras do estudo.

Aos meus maiores presentes nessa jornada do doutorado, que foram dois alicerces, sem os quais seria impossível chegar até aqui: Vandbergue Pereira dos Santos, que com toda paciência e disposição me ensinou muito mais do que eu merecia e além de parceiro de experimentos, me presenteou com um amigo para toda a vida e Jonathas Sales, que tornou meu caminho muito mais leve, sendo fundamental para que os resultados dessa pesquisa pudessem fazer sentido. Vand e Jow, a vocês minha gratidão eterna e contem comigo para tudo.

Aos meus colegas professores e aos alunos dos Cursos de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Ceará/UECE e de Enfermagem/Unifametro, que me engrandecem com a convivência diária e são combustíveis para minha prática pedagógica.

A minha querida Lydia Pantoja, companheira de disciplina, projetos e o exemplo real de que os alunos superam os professores.

Ao Centro Especializado em *Micologia* Médica/UFC, à Central Analítica/UFC, ao Laboratório de *Micologia* Médica da Universidade Federal de Pernambuco e à Universidade Federal do Ceará pela estrutura que proporcionou a execução desse trabalho.

Aos professores e toda equipe vinculada ao Centro Especializado em *Micologia* Médica/UFC pelas contribuições diretas e indiretas para realização do estudo.

Ao meu amado Lucky Paixão, por todos os lambeijos e por esquentar meus pés, pacientemente, em todo o período de escrita da tese. Por meio dele, agradeço a todos os animais, os seres mais perfeitos que Deus criou.

Finalmente, a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte dessa conquista e que porventura não tenham sido citados anteriormente.

*“Não desespere nunca.
A vida é mesmo assim
Um dia para a dor
Um outro para a esperança
E não te furtas
Ao convívio do que é belo
Pois a pureza espera sempre além
Olha como se amam as borboletas
que fiam corpos vivos no mistério
e não dizem versos
porque fazem vãos
O amanhã é sempre diferente.
O amanhã é verde como as folhas
Que apaziguam nossos olhos com seu mar.
Não desespere nunca.
A vida é assim mesmo
Um dia é para o mal.
O outro é pro perdão”.*

(Não desespere nunca- Roberto Pontes)

RESUMO

No Estado do Ceará, têm sido isoladas cepas de *T. tonsurans* com apresentação morfológica atípica, caracterizada pela produção abundante de clamidoconídios. Por conseguinte, os objetivos deste estudo foram: - conhecer os perfis proteico e genético de *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios; - averiguar a capacidade de formação de biofilmes dessas cepas; e - investigar o efeito da terbinafina e do farnesol sobre o biofilme desse dermatófito. Foram analisadas 6 cepas de *T. tonsurans* produtoras de clamidoconídios e 1 cepa padrão *T. tonsurans* ATCC 28942. O perfil proteico foi investigado por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF MS. Na análise genética amplificaram-se as regiões dos loci de ITS e LSU de rDNA e o gene da β -tubulina parcial. As sequências gênicas foram comparadas pela plataforma BLAST, o alinhamento múltiplo obtido com o MAFFT e os dendrogramas montados com o MEGA X. A atividade antifúngica foi avaliada por microdiluição em caldo. O efeito da terbinafina (2 a 128 $\mu\text{g/mL}$) e do farnesol (18,75 a 1200 mM) sobre o biofilme dessas cepas foi avaliado por quantificação de biomassa e atividade metabólica. A morfologia dos biofilmes foi analisada por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal. Nas cepas de *T. tonsurans* produtoras de clamidoconídios observaram-se picos de elevada intensidade da proteína com 4.155 Da e ausência das proteínas de 3.087 Da, 6.177 Da e 6649 Da. Filogeneticamente, as cepas estão alocadas em um único *cluster* e são forte formadoras de biofilme e, embora, produzam menor biomassa, têm atividade metabólica comparável à cepa ATCC 28942. A terbinafina reduziu em 66,22% e 69% a biomassa e a atividade metabólica, respectivamente, e o farnesol reduziu a biomassa em até 65,15% e em 68,43% a atividade metabólica dos biofilmes. A terbinafina reduziu significativamente a biomassa e a atividade metabólica dos biofilmes a partir das concentrações de 4 $\mu\text{g/mL}$ e 2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Já com o farnesol, houve redução significativa da biomassa e da atividade metabólica dos biofilmes a partir das concentrações de 300mM e 18,75mM, respectivamente. Conclui-se que o *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios apresenta alterações fenotípicas significativas, com padrões genotípicos semelhantes e perfil proteico diferenciado. Ademais, a terbinafina e o farnesol apresentaram ação semelhante sobre a biomassa e a atividade metabólica de seus biofilmes, indicando atividade antifúngica do farnesol frente a biofilmes de *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios.

Palavras-Chave: Biofilmes; farneseno álcool; terbinafina; microscopia; espectrometria de massa.

ABSTRACT

In the state of Ceará, we have isolated strains of *T. tonsurans* with atypical morphological presentation, characterized by abundant production of chlamydoconidia. The objectives of this study were threefold: (i) to ascertain the protein and genetic profiles of *T. tonsurans* strains that produce chlamydoconidia; (ii) to investigate the capacity to form biofilms of these strains; and (iii) to observe the effect of terbinafine and farnesol on biofilms of this dermatophyte. We analyzed six strains of *T. tonsurans* that produce chlamydoconidia and one standard strain (ATCC 28942). The protein profile was investigated by MALDI-TOF MS. In the genetic analysis, the ITS and LSU loci regions of rDNA and the partial β -tubulin gene were amplified. The gene sequences were compared by the BLAST platform, the multiple alignment was obtained with MAFFT and the dendograms were plotted with MEGA X. The antifungal activity was evaluated by the broth microdilution method. The effects of terbinafine (2 to 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and farnesol (18.75 to 1200 mM) on the biofilms of these strains were evaluated by quantifying the biomass and measuring the metabolic activity. The morphology of the biofilms was analyzed by scanning electron and confocal microscopies. In the strains of *T. tonsurans* that produce chlamydoconidia, intense protein peaks were observed with 4,155 Da and absence of proteins with 3,087 Da, 6,177 Da and 6,649 Da. From a phylogenetic standpoint, the strains could be allocated in a single *cluster* and were strong biofilm formers. Although these strains produced less biomass, their metabolic activity was comparable to that of the standard strain ATCC 28942. Terbinafine reduced the biomass by 66.22% and the metabolic activity by 69%, while farnesol reduced the biomass by as much as 65.15% and the metabolic activity of the biofilms by 68.43%. Terbinafine significantly reduced the biomass and metabolic activity of the biofilms starting at concentrations of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. In turn, farnesol significantly diminished the biomass and metabolic activity of the biofilms starting at respective concentrations of 300 mM and 18.75 mM. The conclusion is that *T. tonsurans* strains that produce chlamydoconidia have significant phenotypic alterations, with similar genotypic patterns and different protein profiles. Furthermore, terbinafine and farnesol presented similar action on the biomass and metabolic activity of the biofilms, indicating antifungal activity of farnesol against biofilms of *T. tonsurans* strains that produce chlamydoconidia.

Keywords: Biofilms; farnesol; terbinafine; microscopy; spectrometry mass.

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 – Classificação de dermatófitos antropofílicos e zoofílicos de acordo com Graser et al.,(2009) | 21 |
|--|----|

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Árvore filogenética de dermatófitos com base em sequências parciais <i>ITS</i> e <i>LSU</i> , <i>TUB</i> e <i>60S L10</i> | 22 |
| Figura 2 | Principais achados micromorfológicos de cada gênero de dermatófitos..... | 29 |
| Figura 3 | Características macro e micromorfológicas clássicas do <i>Trichophyton tonsurans</i> | 31 |
| Figura 4 | Características macro e micromorfológicas do <i>Trichophyton tonsurans</i> produtor de clamidoconídios..... | 32 |
| Figura 5 | Cadeias de clamidoconídios observadas em <i>Trichophyton tonsurans</i> | 45 |
| Figura 6 | Macrocolônias de <i>Trichophyton tonsurans</i> produtor de clamidoconídios..... | 45 |
| Figura 7 | Microcultivo de <i>Trichophyton tonsurans</i> produtor de clamidoconídios em lamínulas Thermanox..... | 46 |
| Figura 8 | Fluxograma de execução do trabalho..... | |
| Figura 9 | Planos espectrais das cepas de <i>Trichophyton tonsurans</i> produtoras de clamidoconídios obtidos por MALDI-TOF..... | 55 |
| Figura 10 | Dendrograma de <i>Trichophyton tonsurans</i> produtor de clamidoconídios obtido pelo programa MEGAX..... | 56 |
| Figura 11 | Biomassa e atividade metabólica de biofilmes de <i>Trichophyton tonsurans</i> produtor de clamidoconídios expostos a farnesol e terbinafina..... | 58 |
| Figura 12 | Biofilmes de <i>Trichophyton tonsurans</i> produtor de clamidoconídios tratados com terbinafina e farnesol em microscopia eletrônica de varredura..... | 60 |
| Figura 13 | Biofilmes de <i>Trichophyton tonsurans</i> produtor de clamidoconídios tratados com terbinafina e farnesol em microscopia confocal..... | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Sequências gênicas de <i>Trichophyton tonsurans</i> produtor de clamidoconídios depositadas no GenBank..... | 49 |
| Tabela 2 – Sequências gênicas de <i>Trichophyton tonsurans</i> , <i>T. equinum</i> , <i>T. interdigitale</i> e <i>T. mentagrophytes</i> localizadas no GenBank..... | 50 |
| Tabela 3 – Formação de biofilmes, <i>in vitro</i> , de isolados de <i>Trichophyton tonsurans</i> produtor de clamidoconídios..... | 57 |
| Tabela 4 – Concentração inibitória mínima de farnesol e terbinafina frente a biofilmes de <i>Trichophyton tonsurans</i> | 59 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------|---|
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BHI | <i>Brain heart infusion</i> |
| CBS | <i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i> |
| CEMM | Centro Especializado em <i>Micologia Médica</i> |
| CIMB | Concentração inibitória mínima em biofilme |
| CLSI | <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i> |
| Da | Daltons |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DOc | Densidade óptica do controle |
| DOt | Densidade óptica do teste |
| FAR | Farnesol |
| HMDS | Hexametildisilazano |
| ITS | <i>Internal Transcribed Spacer</i> |
| LSU | Large Subunit |
| MALDI-TOF | <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i> |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| MPS | Main Spectra Profile |
| MYC | Ágar Mycosel |
| PBS | <i>Phosphate bufferid saline</i> |
| PDA | Ágar batata dextrose |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rDNA | Ácido desoxibonucleico ribossômico |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| SCA | Ágar Sabouraud com cloranfenicol |
| SDA | Ágar Sabouraud Dextose |
| TUB | Tubulina |
| TRB | Terbinafina |
| Ufc | Unidade formadora de colônia |

XTT

2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[carbonilofenilamino]-2-tetrazóliohidróxido

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 17 |
| 2.1 | Generalidades e taxonomia dos dermatófitos | 17 |
| 2.2 | Marcos históricos na descrição do <i>Trichophyton tonsurans</i> | 24 |
| 2.3 | Epidemiologia das dermatofitoses causadas por <i>Trichophyton tonsurans</i> | 26 |
| 2.4 | Aspectos parasitários de <i>Trichophyton tonsurans</i> | 27 |
| 2.5 | Identificação fenotípica dos dermatófitos, com ênfase no <i>Trichophyton tonsurans</i> | 28 |
| 2.6 | Identificação molecular e proteica dos dermatófitos..... | 33 |
| 2.7 | Biofilmes como fator de virulência de dermatófitos | 37 |
| 2.8 | Tratamento da <i>tinea capitis</i> | 39 |
| 3 | HIPÓTESES..... | 42 |
| 4 | OBJETIVOS | 43 |
| 4.1 | Objetivo geral..... | 43 |
| 4.2 | Objetivos específicos | 43 |
| 5 | MATERIAL E MÉTODOS | 44 |
| 5.1 | Local de estudo..... | 44 |
| 5.2 | Caracterização morfológica e seleção dos microrganismos utilizados no estudo | 44 |
| 5.3 | Desenho experimental | 47 |
| 5.4 | Análise do perfil proteico | 47 |
| 5.5 | Análise do perfil genético | 48 |
| 5.5.1 | Extração e amplificação do DNA..... | 48 |
| 5.5.2 | Sequenciamento do DNA e busca de sequências similares..... | 49 |
| 5.5.3 | Alinhamento múltiplo e análise filogenética | 50 |
| 5.6 | Formação de biofilmes | 51 |
| 5.7 | Sensibilidade dos biofilmes diante da Terbinafina e do Farnesol | 52 |
| 5.8 | Análise microscópica dos biofilmes | 53 |
| 5.9 | Análise estatística..... | 54 |
| 6 | RESULTADOS | 55 |
| 6.1 | Perfil proteico..... | 55 |
| 6.2 | Perfil genético..... | 56 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 6.3 | Formação e sensibilidade dos biofilmes diante da terbinafina e do Farnesol | 57 |
| 7 | DISCUSSÃO | 62 |
| 8 | CONCLUSÕES..... | 70 |
| | REFERÊNCIAS | 71 |
| | APÊNDICE A – GLOSSÁRIO DE TERMOS MICOLÓGICOS E | |
| | TAXONÔMICOS | 88 |
| | APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO COM DADOS DA TESE..... | 92 |
| | APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO COM DADOS DA TESE | 93 |
| | APÊNDICE D – CAPÍTULO DE LIVRO INTERNACIONAL PUBLICADO | |
| | SOBRE O OBJETO DA TESE. | 94 |

1 INTRODUÇÃO

Os dermatófitos são os principais agentes infecciosos envolvidos na etiopatogenia das micoses superficiais, podendo afetar entre 20 e 25% da população mundial (CALDERARO et al., 2014, COULIBALY et al., 2018). A frequência e o espectro de distribuição desses fungos nas populações evoluem com a geografia, condições socioeconômicas e climáticas (HEIDRICH et al., 2015, VEASEY et al., 2017, DE HOOG et al., 2017).

Assim, espécies como *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouinii* e *Trichophyton schoenleinii* que, no passado, se destacavam como os principais fungos dermatofíticos tiveram suas incidências bastante diminuídas ao longo dos últimos 100 anos, enquanto outras espécies como o *Trichophyton tonsurans* destacam-se, progressivamente, como principal agente de *tinea capitis* em vários países da Europa, em especial no Reino Unido e França, nos Estados Unidos, Japão, África e Caribe (ZHAN, LIU, 2017, GRAY et al., 2015, HIRUMA et al., 2015, DURAN-VALLE et al., 2016, MOCHIZUCHIT et al., 2017, BHAT et al., 2017), aumentando consideravelmente suas taxas de isolamento laboratorial, e elevando-se a patógeno emergente.

No Ceará, o *T. tonsurans*, há mais de duas décadas, é descrito como a espécie de dermatófito mais isolada em *tinea capitis* (BRILHANTE et al., 2000, SIDRIM et al., 2013, BRILHANTE et al., 2019, BRILHANTE et al., 2021) e expressa uma, ainda inexplicada, apresentação morfológica atípica com a produção constante e abundante de clamidoconídios em cadeia associada ao desenvolvimento de colônias glabrasas, com pouco micélio aéreo e intenso pigmento amarelo ferrugem, achados esses bastante diferenciados das descrições clássicas de *T. tonsurans* (BRILHANTE et al., 2019, BRILHANTE et al., 2021).

A identificação precisa desses fungos é fundamental para o estabelecimento de programas efetivos de controle e prevenção das dermatofitoses, bem como para determinar as terapias antifúngicas mais apropriadas e eficazes (CAFARCHIA et al., 2013).

Tradicionalmente, os dermatófitos são identificados com base em sintomas clínicos, preferências ecológicas, características morfológicas *in vitro* e no comportamento fisiológico das espécies (CAFARCHIA et al., 2013, DE HOOG et al., 2017; BAERT et al., 2020). Porém a instabilidade fenotípica, aliada a plasticidade microbiana apresentada por algumas espécies, pode produzir classificações errôneas e superdimensionadas, fazendo com que a identificação desses fungos permaneça

desafiadora, mesmo para micologistas mais experientes. Logo, a caracterização morfofenotípica dos dermatófitos tem limitações e não deve mais ser usada como único critério taxonômico, sendo altamente desejável a combinação de diferentes abordagens, incluindo o estudo dos perfis genotípico e proteico na identificação precisa desses fungos.

Nos últimos anos, significativos avanços estão sendo obtidos por meio do estudo do perfil genotípico e proteico desses fungos (L'OLLIVIER et al., 2013; AHMADI et al., 2015; CALDERARO et al., 2014; KOC et al., 2017, L'OLLIVIER, RANQUE, 2017), o que vem permitindo identificar, inclusive, variações intraespécies (MOCHIZUKI et al., 2017). No entanto, a aplicação da maioria desses estudos ainda está restrita basicamente às espécies *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (KUPSCH et al., 2016; AHMADI et al., 2015; MOCHIZUCHI et al., 2017; KOC et al., 2017), sendo escassos e pouco consistentes os estudos que utilizam o *T. tonsurans* como modelo experimental.

Mais recentemente, especial atenção vem sendo dedicada aos biofilmes como fator de virulência na patogenia de infecções humanas causadas por bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Acredita-se que cerca de 65% dessas infecções envolvem microrganismos integrados em comunidades que aderem às superfícies ou interfaces, envoltas por uma densa matriz exo-polissacarídica, nomeadas de biofilmes (VASANTHI et al., 2014).

Para Trentin et al., (2013), os dermatófitos podem estar associados a formação de biofilme *in vivo*, o que justificaria a presença de elementos fúngicos vivos, como hifas e arthroconídios, nos diferentes tecidos queratinizados, podendo resultar em resistência às terapias tradicionais.

Adicionalmente, alguns pesquisadores vêm demonstrando a formação, arquitetura e sensibilidade de biofilmes em dermatófitos (COSTA-ORLANDI et al., 2014; DOS SANTOS; DIAS-SOUZA, 2017; BRILHANTE et al., 2017). Mas, a exemplo dos estudos genotípicos e proteômicos, o que se conhece até o momento está mais direcionado às espécies de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, restando uma intrigante lacuna em outras espécies como o *T. tonsurans*.

Por fim, alguns estudos relatando tolerância ou resistência dos dermatófitos frente aos antifúngicos utilizados na prática clínica (BURKHARTA; BURKHART; GUPTA, 2002; GHANNOUM, 2016; MAJID et al., 2016) estão sendo publicados e acredita-se que, dentre os fatores que podem estar associados à reduzida sensibilidade a medicamentos antifúngicos, estão os biofilmes (INDIRA, 2014; MAJID et al., 2016;

RAMAGE et al., 2012). Deste modo, avaliar o efeito da terbinafina e do farnesol sobre biofilmes do *T. tonsurans* produtor de clamidoconídio pode colaborar na busca de novos agentes com atividade antifúngica, em especial para o tratamento de *tinea capitis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Generalidades e taxonomia dos dermatófitos

Os dermatófitos são fungos filamentosos estreitamente relacionados e caracterizados por sua capacidade de invadir e infectar tecidos queratinizados (BAERT, et al., 2020; CAFARCHIA et al., 2013; WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995). Pertencem aos grupos mais antigos de microrganismos que foram reconhecidos como agentes de doenças humanas, podendo afetar entre 20 e 25% da população mundial., causando as dermatofitoses (CALDERARO et al., 2014; DABAS et al., 2017).

Segundo Ajello (1974), esses fungos datam da era pré-histórica e as infecções por eles causadas acometem seus hospedeiros ao longo de milhões de anos. A primeira referência histórica de uma infecção por dermatófito é atribuída a Aulus Cornelius Celsus, que em sua obra intitulada "De Re Medicina" datada de aproximadamente 30 D.C, relata um caso de lesão supurativa no couro cabeludo que ele denominou de *Kerion de Celsus*.

A história da micologia médica teve início com o estudo dos dermatófitos, quando, em 1839, Robert Remak elucidou a etiologia do "*Favus*". Alguns anos mais tarde, em 1842, David Gruby redescobre o agente etiológico do "*Favus*", cria o gênero *Microsporum* e reafirma a etiologia fúngica de todas as tinhas. Desde então, a taxonomia dos dermatófitos tem mudado de forma dinâmica (KANDEMIR et al., 2020), oscilando entre períodos com a explosão da descrição de numerosas espécies e outros com a fusão e/ou redução de seus representantes.

Entre 1840 e 1875, cinco das principais espécies dermatofíticas, a saber: *Microsporum audouinii*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton mentagrophytes* já haviam sido descritas (DE HOOG et al., 2017).

Na última metade do século XIX, a micologia médica vivenciou um ostracismo científico, até que em 1910, o eminente dermatologista francês Raymond Jacques Andrien Sabouraud, formado no Instituto Pasteur, publica o tratado "Les teignes", um marco histórico, que tentava normalizar o conhecimento vigente na época, do tópico mais frequentemente diagnosticado em micologia: os dermatófitos (MONOD, 2017; PAIXÃO et al., 2020). Assim, Sabouraud considerando somente o aspecto clínico das lesões e o modo de parasitismo do fungo no hospedeiro, dividiu-os em: *Microsporum*, *Trichophyton* endotrix, *Trichophyton* microide, *Trichophyton* megaspórico, *Achorion*, *Epidermophyton* (RIVALIER, 1966; KANDEMIR et al., 2020).

Durante as décadas que se seguiram, com conceitos confusos e a aplicação de novos padrões metodológicos, houve uma explosão de novas espécies e nomes recombinados, o que levou a introdução de numerosas taxa que são agora considerados sinônimos de espécies anteriormente descritas. Até por volta de 1950 era possível encontrar cerca de 350 nomes para as mais variadas espécies de dermatófitos (DE HOOG et al., 2017).

Em 1934, o micologista americano Chester Wilson Emmons, propôs um novo modelo de morfotaxonomia de dermatófitos, e sugeriu uma classificação baseada em aspectos microscópicos dos conídios formados e na capacidade dos dermatófitos em crescer em meios de cultura especiais, feitos à base de grãos de cereais. Assim, Emmons propõe uma taxonomia redutiva, extingue o gênero *Achorion* e o encampa dentro do gênero *Trichophyton*, ficando os dermatófitos classificados em três gêneros: *Epidermophyton*, *Trichophyton* e *Microsporum* e somente 19 espécies (BADILLET, 1986; GRASER et al., 2018; MONOD, 2017).

O gênero *Epidermophyton* (Sabouraud, 1910) é caracterizado pela presença de macroconídios de paredes finas agrupados em cachos e ausência de microconídios, representado exclusivamente pela espécie *E. floccosum*; já no gênero *Microsporum* (Gruby, 1843), as espécies apresentam macroconídios de paredes mais ou menos espessas, superfície equinulada ou verrucosa e tamanho grande associados a microconídios e o gênero *Trichophyton* (Malmsten, 1848) apresenta como característica mais representativa numerosos microconídios de forma e tamanhos bastante variados, apresentando-se ora ovais, ora piriformes ou ainda arredondados associados a raros macroconídios de parede lisa associadas; nesse último gênero foram englobados as espécies endotrix, ectotrix microide e ectotrix megaspórico da classificação de Sabouraud (EMMONS, 1934).

A partir de 1960, teve início uma nova etapa no conhecimento dos dermatófitos, com o redescobrimto da forma de reprodução sexuada de algumas espécies, visto que até então, os pesquisadores ainda não tinham sido convencidos da existência de processos de reprodução sexuada nesse grupamento fúngico, apesar dos trabalhos clássicos desenvolvidos por Nannizzi que, em 1927, realizou uma série de cultivos obtendo cleistotécios a partir de uma cepa de *Microsporum gypseum* isolada do solo. Não foi por acaso que o interesse do mundo científico para as formas sexuadas dos dermatófitos tenha tomado forte impulso a partir dos experimentos de Griffin que culminaram no

redescobrimto do estado teleomórfico da mesma espécie outrora descrita por Nannizzi (TAKASHIO, 1979; REBELL, TAPLIN, 1970).

Dessa maneira, os dermatófitos que apresentavam reprodução sexuada e pertenciam ao gênero *Trichophyton* passaram a ser denominados de *Arthroderma*, e os fungos do gênero *Microsporum*, foram nominados de *Nannizzia*. Entretanto, Weitzman et al., em 1986, considerando que esses dois gêneros (*Nannizzia* e *Arthroderma*) possuíam características morfológicas muito similares, funde-os em único gênero, o *Arthroderma*, obedecendo à lei taxonômica que dá preferência à denominação mais antiga.

Essa nomenclatura dupla, de acordo com os estágios sexuais (teleomorfos) ou assexuais (anamorfos), perdurou até recentemente, quando dois congressos realizados em Amsterdã, Holanda, nos anos de 2011 e 2012 resultaram na elaboração da Declaração de Amsterdã de nomenclatura fúngica, por meio da qual solicitou-se a abolição do artigo 59 do Código de nomenclatura botânica, dispositivo que sancionava nomes múltiplos para o mesmo fungo. Assim, desde janeiro de 2013, o sistema de nomenclatura dupla para os fungos não é mais permitido (DE HOOG et al., 2015a).

Segundo Hibbett et al. (2007), os dermatófitos pertencem ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Eurotiomycetes, subclasse Eurotiomycetidae e ordem Onygenales.

Com base em sua ecologia, são divididos em três grupos: antropofílicos, zoofílicos e geofílicos. Os dermatófitos antropofílicos são restritos a hospedeiros humanos e produzem inflamação crônica leve; já os zoofílicos usam reservatórios animais, como cães, gatos, cavalos e, ocasionalmente infectam humanos, desenvolvendo lesões bastante inflamatórias. Por fim, os dermatófitos geofílicos estão presentes no solo que contém materiais queratinosos, como cabelos, pelos e penas, podendo ser transmitidos a humanos e animais pelo contato com o solo (MONOD, 2017; COULIBALY et al., 2018).

A análise conjunta das características macroscópicas das colônias e dos aspectos microscópicos das estruturas de frutificação (macro e microconídios) e de ornamentação (hifas em espiral, hifas pectinadas, candelabros fávicos, dentre outras) funcionaram bem como parâmetros de diagnóstico quando isolados recentes eram usados, mas era difícil manter e reproduzir estas características por causa do rápido polimorfismo de alguns dermatófitos (DE HOOG et al., 2017).

Em 1983, Weitzman et al., introduziram um personagem adicional na identificação desses fungos, os chamados ágar *Trichophyton* (T1 a T7), os quais agregam características fisiológicas como a capacidade das cepas em assimilar um painel de

vitaminas e aminoácidos essenciais, associados à temperatura de crescimento, liquefação de gelatina, etc. Assim, o método convencional de taxonomia dermatofítica passou a combinar a aparência clínica, características culturais, microscopia e fisiologia (DE HOOG et al., 2017), e juntamente com o sistema de acasalamento das espécies deu origem à escola britânica/norte-americana de taxonomia dos dermatófitos, a qual foi amplamente difundida por Gerbert Rebell e David Taplin (HAYETTE; SACHELLI, 2017).

Nos últimos anos do século XX, tornou-se mais evidente que a morfologia não poderia ser usada como única característica para classificação ou identificação dos dermatófitos, já que com a instabilidade fenotípica presente em algumas espécies, é possível termos variações morfológicas dentro de uma mesma espécie e diferentes espécies podem mostrar aparência fenotípica similar (MONOD, 2017), fato que contribuiu para produção de classificações erradas e superdimensionadas, como consequência inevitável deste sistema de diagnóstico baseado somente no fenótipo (DE HOOG et al., 2017).

Nesse ínterim, o advento e popularização crescente de métodos moleculares contribuíram para a compreensão da biodiversidade desses fungos, desafiando a classificação vigente. A entrada na era moderna da biosistemática fez com que Graser et al., propusessem a primeira filogenia molecular dos dermatófitos em 1999 (HAYETTE, SACHELLI, 2017). Esses pesquisadores realizaram o sequenciamento da região ITS rDNA e agruparam os dermatófitos com base em suas características clínicas e ecológicas, em detrimento das características morfológicas, e por meio de reconstruções filogenéticas de sequências ITS, separaram as espécies geofílicas dos membros remanescentes de *Arthrodermataceae*, os quais foram referidos como verdadeiros dermatófitos. Nesse sentido, uma nova classificação de dermatófitos antropofílicos e zoofílicos foi proposta conforme quadro 1.

Esses estudos filogenéticos iniciais foram fortemente influenciados pelas estreitas relações evolutivas entre as espécies de dermatófitos, o que desencadeou num colapso significativo no número de espécies reconhecidas (HAYETTE; SACHELLI, 2017).

Interessante registrar que, embora os dermatófitos geofílicos tenham ficado de fora da classificação proposta por Graser et al., as espécies dermatofíticas causadoras de infecções humanas descritas nos últimos 20 anos são quase todas relacionadas ou pertencente ao grupo dos dermatófitos geofílicos tais como *T. eboreum*, *T. onychola* e *M. mirabile*. Tal fato se deve, provavelmente, porque os dermatófitos geofílicos são mais

susceptíveis a variações genéticas do que os zoofílicos e antropofílicos (HAYETTE, SACHELLI, 2017).

Quadro 1. Classificação de dermatófitos antropofílicos e zoofílicos de acordo com Graser et al., (1999).

| Complexo teleomórficos | Anamorfos / hospedeiros relacionados |
|---|--|
| Complexo <i>Arthroderma Otae</i> | <i>M. canis</i> / gatos, cães e cavalos (incluindo os antigos taxa <i>M. equinum</i> , <i>M. distortum</i>) <i>M. audouinii</i> / humanos (incluindo var. <i>rivalieri</i> e <i>langeronii</i>) <i>M. ferrugineum</i> / humanos |
| Complexo <i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> | <i>T. tonsurans</i> / humanos <i>T. equinum</i> / equinos <i>T. interdigitale</i> (incluindo espécies zoofílicas como <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> , var. <i>granulosum</i>) <i>T. verrucosum</i> var. <i>autotrophicum</i> espécies antropofílicas como <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>goetzii</i> , <i>T. nodulare</i> e <i>T. krajdienii</i>) |
| Complexo <i>Arthroderma simii</i> | <i>T. simii</i> / macacos <i>T. mentagrophytes</i> / camundongos, camelos (incluindo <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>quinckeanum</i> , <i>T. langeronii</i> , <i>T. sarkisovii</i>) <i>T. schoenleinii</i> / humanos |
| Complexo <i>Arthroderma benhamiae</i> | <i>T. erinacei</i> / ouriços <i>T. verrucosum</i> / bovinos <i>T. concentricum</i> / humanos <i>T. bullosum</i> / equinos |
| Complexo <i>Trichophyton rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> de origem africana / humanos (incluindo os antigos taxa de <i>T. raubitschekii</i> , <i>T. soudanense</i> , <i>T. gourvilii</i> , <i>T. megninii</i>) <i>T. rubrum</i> / humanos (incluindo os antigos taxa de <i>T. fischeri</i> , <i>T. kanei</i> , <i>T. raubitschekii</i>) <i>T. violaceum</i> / humanos (incluindo os antigos taxa de <i>T. yaoundei</i> , <i>T. glabrum</i>) |

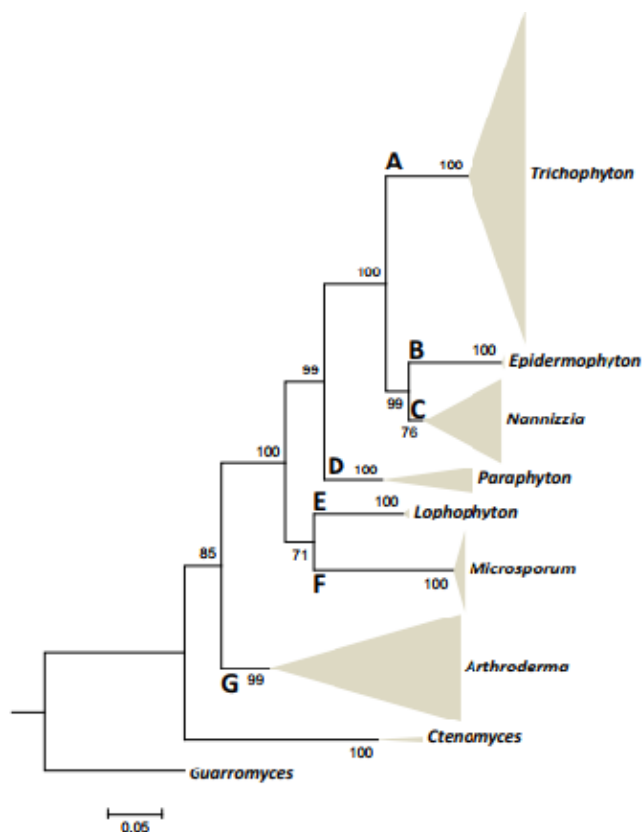
Fonte: traduzido de Cafarchia et al., (2013).

Como nos dias de Louis Pasteur, quando a cultura axênica revolucionou a microbiologia, a aplicação de métodos moleculares também revolucionou a taxonomia

dos dermatófitos e de outros fungos patogênicos. Porém, embora a abordagem molecular tenha sido capaz de resolver os principais traços da evolução dermatófito, observou-se falhas desta caracterização. Várias espécies bem estabelecidas como sendo espécies diferentes de *Trichophyton* (*Trichophyton rubrum*, *T. violaceum*, *T. equinum* e *T. tonsurans*) e algumas espécies de *Microsporum* (*Microsporum audouinii*, *M. canis* e *M. ferrugineum*) pareciam indistinguíveis quando se usava a análise de multilocus. Pequenas ambiguidades de sequenciamento ou falta de dados desfocavam pequenas diferenças entre as espécies emergidas recentemente, logo, a identificação dos dermatófitos ainda permanecia desafiadora (DE HOOG, et al., 2017).

Mais recentemente, os dermatófitos começaram a ser estudados sob a perspectiva filogenética (MARTINEZ et al., 2012; ACHTERMAN; WHITE 2012; BAERT et al., 2020) e em 2017, De Hoog et al. propuseram, a partir da análise multi-loci de sequências parciais de ITS e LSU, TUB e 60S L10 de cepas de dermatófitos depositadas na coleção de referência da Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), uma nova classificação para esses fungos, dividindo-os em 7 clados, compreendendo os gêneros *Arthroderma*, *Epidermophyton*, *Lophophyton*, *Microsporum*, *Nannizzia*, *Paraphyton*, *Trichophyton* (figura 1)

Figura 1. Árvore filogenética de dermatófitos com base em sequências parciais ITS, LSU, TUB e 60S L10.



Fonte: Traduzido de De Hoog et al. (2017).

De acordo com a classificação acima descrita, o *Trichophyton tonsurans* se situa no clado *Trichophyton*, que por sua vez reúne quatro séries de espécies reconhecíveis: série *T. mentagrophytes* e espécies antropofílicas e zoofílicas relacionadas, como *T. interdigitale* e *T. tonsurans*; série *T. benhamiae* com os representantes *T. schoenleinii* e *T. verrucosum*; série das espécies zoofílicas como *T. bullosum* e a série do complexo *T. rubrum*, em que nenhuma espécie individual pode ser distinguida.

Ainda segundo a classificação filogenética defendida por De Hoog et al. (2017), os cladogramas são considerados gêneros, assumindo-se a nomenclatura mais antiga para cada clado, exceto para o clado *Trichophyton*, cuja denominação ainda é preferida em relação à *Achorion*, descrita originalmente por Remak, em 1845, portanto 3 anos antes da descrição do *Trichophyton* por Malmsten. Uma proposta de conservação do nome mais antigo também para esse clado está sendo preparada (DE HOOG et al., 2017).

Mesmo com a descrição alargada de 7 gêneros, a denominação de dermatófito, no sentido estrito da palavra, só pode ser utilizada para as aproximadamente 30 espécies classificadas nos gêneros *Microsporium*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (COULIBALY et al., 2018) que são queratinofílicas e capazes de causar patologias em homens e animais,

ficando as demais espécies classificadas como um grupamento correlacionado, mas que não é considerado um dermatófito.

Por fim, junto com esses estudos de filogenia, surgiu um renovado interesse mundial no estudo da taxonomia dos dermatófitos, o que inclusive motivou a *International Society for Human and Animal Micology*- ISHAM a criar em 2017 um grupo de trabalho sobre dermatófitos, o qual busca estimular e coordenar uma rede internacional relacionada ao estudo desses fungos (GRASER et al., 2018). Assim, é possível que em breve, novas informações sejam agregadas ao estudo sistematizado desses fungos.

2.2 Marcos históricos na descrição do *Trichophyton tonsurans*

O *Trichophyton tonsurans* foi visualizado, pela primeira vez, por David Gruby em 1844, em espécimes clínicos oriundos de pacientes com "*Tinea tonsurante* de Mahon" ou "*Herpes tonsurans* de Cazenave". Em 1848, o pesquisador sueco Per Hendrick Malmsten revisitou os trabalhos iniciais de Gruby e publicou a descrição detalhada de uma entidade clínica similar, descrevendo-a minuciosamente e ilustrando o fungo envolvido. Malmsten também demonstrou claramente, o tipo de parasitismo endotrix do fungo e propôs inicialmente a denominação de *Trichophyton tonsurans* (GEORG, 1956a; GEORG, 1975; KANDEMIR et al., 2020).

O uso genérico do nome *Trichophyton* foi resultante da junção dos radicais gregos *Tricho* = cabelo e *Phyton* = planta. Um pouco mais tarde, Malmsten reconhecendo a natureza fúngica desse microrganismo, propôs uma modificação no nome do gênero de *Trichophyton* para *Trichomyces*, onde *Tricho*= cabelo e *myces*= fungo (GEORG, 1956a). Apesar dessa última denominação ser a correta, prevaleceu a denominação inicial de *Trichophyton*, sendo esta aceita até os dias atuais.

Por essa época, a denominação *T. tonsurans* passou a ser usada erroneamente para nomear todos os agentes fúngicos isolados de *Tineas* tonsurantes (GEORG, 1956a) e ainda não se conhecia sua ecologia estritamente antropofílica, o que pode ser constatado nos relatos de Mégnin, que ao dedicar grande parte da sua vida estudando as dermatofitoses em animais, apontou o *T. tonsurans* como responsável por lesões em cavalos, cães e gatos (GEORG, 1956b). Nos dias atuais, acredita-se que a espécie a que Mégnin outrora se referiu deve ser o *T. mentagrophytes*, pois de todos os dermatófitos zoofílicos, esse é o que acomete com maior frequência esses diferentes tipos de hospedeiros.

Esse foi apenas um dos exemplos que marca o início de uma série de confusões e erros na taxonomia desse fungo e a criação de suas muitas variações morfológicas.

Em 1866, o cientista alemão P. Grawitz estudou, pela primeira vez, esse fungo em cultura, analisando detalhadamente seus aspectos parasitários em espécimes clínicos, as características das colônias em meios de cultura e ainda reproduziu experimentalmente a doença através da inoculação de fragmentos da sua colônia em dois voluntários (GEORG, 1956b).

Ao longo da história da *micologia* médica, o *T. tonsurans* acumulou vários sinônimos. Lucile Georg, em 1956, fez excelente compilação, encontrando pelo menos 43 sinônimos para essa espécie, desde a denominação inicial de Malmsten até a proposta de Orbtel, em 1950, de denominá-lo de *Endotrix acuminatum*. Dentre as primeiras sinonímias sugeridas destacamos *Oidium tonsurans* (Zopf, 1890), *Trichophyton crateriforme* (Bodin, 1902) e *Trichophyton acuminatum* (Bodin, 1902). Somente Sabouraud descreveu 11 sinônimos para esse fungo, sendo os mais célebres: *Trichophyton cerebriforme*, *Trichophyton plicate*, *Trichophyton pilosum* e *Trichophyton sulfureum* (BADILLET, 1986).

Além dessas sinonímias comprovadamente referentes ao *T. tonsurans*, alguns relatos fragmentados da literatura nos fazem acreditar que outros nomes também podem ter sido utilizados, para designar esse fungo tais como *Trichophyton depilans* (Méglin, 1878) e *Trichophyton epilans* (Boucher, 1887) (AJELLO, 1974; PADHYE et al., 1994).

Lucille Georg também estudou os aspectos nutricionais do *T. tonsurans*, tendo esclarecido a forte influência positiva da tiamina (vitamina B1) no crescimento de suas colônias, o que logo foi contestado por alguns trabalhos que demonstraram várias cepas com comportamento diferente, nas quais a ação estimuladora da tiamina pouco se sobressaia ou até era nula (DROUEHT, 1952).

A possibilidade da existência do estado sexuado desse fungo foi amplamente estudada por vários pesquisadores. No entanto, os resultados não foram nada animadores, conforme dados demonstrados por Stockdale, em 1981, corroborados por Kinbara et al. (1981) e Hayashi e Takashio (1984), os quais após inúmeras estimulações sexuais do *T. tonsurans* com formas perfeitas tais como o *Arthroderma simii*, concluíram que o *T. tonsurans* possui somente núcleos representados pelo sinal (-), sugerindo que essa espécie não possui forma perfeita, uma vez que para haver a reprodução sexuada faz-se necessário a fusão de dois núcleos de sinais contrários produzidos pela mesma espécie.

Badillet, em 1986, se dedicou ao estudo das características coloniais desse fungo e descreveu quatro variedades, a saber: *T. tonsurans* var. *acuminatum* quando a colônia tem uma pequena apiculação central circunscrita por pregas radiais, *T. tonsurans* var. *cerebriforme* quando predomina um relevo com aspecto de circunvoluções no centro da colônia, *T. tonsurans* var. *crateriforme*, quando a colônia apresenta uma forte depressão central e por fim, *T. tonsurans* var. *sulfureum* que mostra uma depressão central associada a um forte pigmento amarelado.

Desde meados da década de 1990, alguns trabalhos estão sendo dedicados ao estudo do perfil filogenético do *T. tonsurans* através de diversas técnicas biomoleculares (GRASER et al., 1998; KIM et al., 1999; LIU et al., 1999). Em um dos mais complexos estudos moleculares da espécie, realizado em 1999 por Graser et al. esses autores sugerem que a espécie dermatofítica mais próxima do *T. tonsurans* é o *T. mentagrophytes*. Não obstante, o uso, ainda limitado, dessas técnicas moleculares no estudo dos dermatófitos aliados ao baixo poder de sensibilidade intraespecífica desses métodos genéticos deixa, até o presente momento, uma grande lacuna nos estudos mais aprofundados, relacionados a genética dessa espécie.

Já Kandemir et al. (2020), apontam que o *T. tonsurans* parece ter origem evolutiva a partir de *T. equinum*, que é um dermatófito zoofílico descrito originalmente por Matruchot e Dassonville, em 1898 (VERALDI; GENOVESE; PEANO, 2018). Esses autores defendem que essas duas espécies podem produzir características morfológicas e fisiológicas difíceis de distinguir, sendo a diferenciação, nessas situações, possível somente considerando características genéticas e reprodutivas e que a diferenciação evolutiva de *T. tonsurans* e *T. equinum* deve ser relativamente recente, sendo que o processo de especiação pode ainda não estar completo.

2.3 Epidemiologia das dermatofitoses causadas por *Trichophyton tonsurans*

Trichophyton tonsurans é um patógeno ubíquo e um importante agente de *tinea capitis* em crianças e adultos, desencadeando inúmeras microepidemias em locais muito populosos como creches e escolas e até mesmo pequenos surtos em pacientes hospitalizados em alas de confinamento (GRAY et al., 2015; HEIDRICH et al., 2015; BHAT et al., 2017; BOUCHARA et al., 2017; COULIBALY et al., 2018; GNAT et al., 2020).

As infecções causadas por *T. tonsurans* se manifestam com apresentações clínicas bem variáveis (ABDEL-RAHMAN et al., 2008), pois além do acometimento do couro

cabeludo, também pode parasitar regiões de pele glabra e mais raramente unhas, abrangendo um espectro que engloba desde o estado de portador assintomático, perpassa por um processo não inflamatório persistente e pode desenvolver-se como uma doença altamente inflamatória aguda (HAY et al., 1996). No entanto, em geral., as lesões por ele desenvolvidas não são inflamatórias, embora sejam observados esporadicamente pontos de supuração como os vistos nos *kérions* (MIKAEILI et al., 2019).

Trata-se de um dermatófito antropofílico, isolado em todos os continentes habitados pelo homem, porém com incidência variando acentuadamente por região geográfica (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995). Na América do Norte e Japão é endêmico, sendo responsável pela grande maioria das infecções pediátricas e por lesões em praticantes de esporte de contato e presente também, em altas taxas, em portadores assintomáticos (HIROSE et al., 2012; HIRUMA et al., 2015). Na Europa e no leste da Ásia, com frequência é associado a surtos epidêmicos (ABDEL-RAHMAN et al., 2010; BAERT et al., 2020). No nordeste brasileiro, especialmente no estado do Ceará, o *T. tonsurans*, desde o início da década de 2000 desponta como um importante patógeno emergente, sendo a espécie dermatofítica mais isolada em *tinea capitis* (BRILHANTE et al., 2019; BRILHANTE et al., 2021).

Desta forma, o interesse no estudo mais detalhado dos aspectos parasitários e culturais do *T. tonsurans* é uma consequência natural diretamente relacionada à frequência de seus isolamentos nos serviços de *micologia* médica.

2.4 Aspectos parasitários de *Trichophyton tonsurans*

Em lesões do couro cabeludo, esse microrganismo é encontrado quase que exclusivamente no interior dos pelos, substituindo sua estrutura central por hifas hialinas septadas e cadeias de arthroconídios grandes que medem entre 4 e 7,5 μ m de diâmetro, exercendo um parasitismo do tipo endotrix. Em decorrência do preenchimento da estrutura central do pelo por uma grande quantidade de estruturas fúngicas, o pelo pode ter seu diâmetro distendido em função do aumento da pressão interna, além de se tornar extremamente frágil e quebradiço, conferindo-lhe um aspecto visual alterado, conhecido como pelos tonsurados (BADILLET, 1986; SAKATA et al., 2018).

Clinicamente, as áreas do couro cabeludo parasitadas se caracterizam pelo aparecimento de numerosas placas pequenas de alopecia, onde se observam fragmentos curtos de pelo emergindo dos folículos pilosos implantados em escamas de pele, que

algumas vezes, podem apresentar uma coloração mais escura, caracterizando áreas de "black dot", bastante peculiares (NENOFF et al., 2014; MIKAEILI et al., 2019).

Quando o fungo acomete regiões de pele glabra e unhas, o achado parasitário é representado pelo aparecimento de hifas hialinas septadas e artroconidiadas associadas ou não a cadeias de artroconídios. As lesões desenvolvidas na pele têm formato circinado, regular, de crescimento concêntrico tendendo à formação de pequenas pápulas ou vesículas periféricas circunscrevendo todo o diâmetro da lesão. Quando há o comprometimento da unha, geralmente este se inicia pelo bordo distal e culmina com o descolamento parcial ou total da lâmina ungueal., com a unha adquirindo aspecto opaco, esbranquiçado e espesso (SIDRIM; ROCHA, 2004).

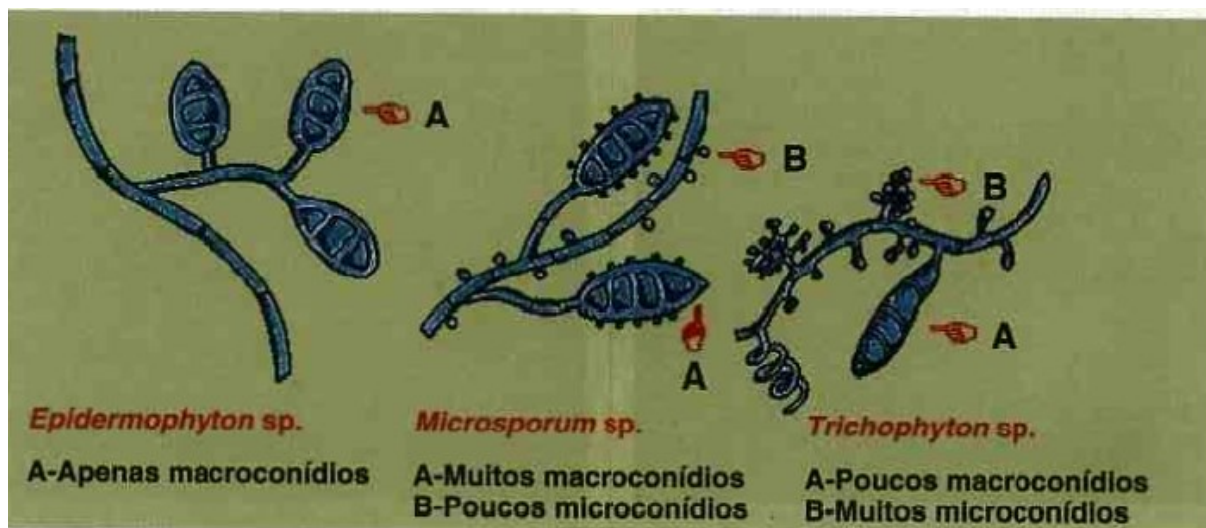
2.5 Identificação fenotípica dos dermatófitos, com ênfase no *Trichophyton tonsurans*

A identificação dos dermatófitos nos laboratórios de rotina de *micologia* médica ainda é definida prioritariamente por aspectos fenotípicos, combinando a morfologia das colônias, micromorfologia dos macroconídios e microconídios com características fisiológicas como a produção da enzima urease, teste da perfuração do pelo, crescimento em grãos de arroz, assimilação de sorbitol e requerimentos de certas vitaminas com a tiamina, e algumas outras fontes de carbono inorgânico como o inositol (BASTERT; KORTING, 1998; PIHET et al., 2017; SUH; GROSSO; CARRION, 2018).

No que tange aos aspectos macroestruturais das colônias fúngicas, deve-se considerar o tamanho e velocidade de crescimento, características das bordas, textura, relevo e pigmentação. Quanto ao tamanho, a colônia pode apresentar-se com tamanho variável, dependendo da qualidade e quantidade do meio de cultura ofertado. Na periferia das colônias podem ser observados muitos desenhos, que vão desde morfologias bem definidas até achados de projeções irregulares. Segundo Sidrim e Rocha (2004), a textura é o mais importante achado utilizado na caracterização de uma colônia fúngica, podendo estas serem classificadas em: algodonosas, furfuráceas, penugentas, arenosas, veludas e glabrasas. No tocante ao relevo/topografia, as colônias podem se apresentar colônias cerebriformes (topografia formada por altos e baixos, com circunvoluções que lembram o aspecto do cérebro), rugosas (com pregas topográficas a partir do centro da colônia), apiculadas (apresentam um pequeno cume do centro da colônia) ou crateriformes (que se aprofundam no meio, assumindo o aspecto de cratera). Por fim tem-se a pigmentação das colônias, onde além da cor deve-se observar se o pigmento é restrito à colônia ou difusível no meio de cultura.

Em adição, os dermatófitos também são identificados e diferenciados por meio de suas estruturas reprodutivas e as de ornamentação. As estruturas reprodutivas, também conhecidas como estruturas de frutificação ou conídios são avaliadas quanto ao tamanho (macroconídios ou microconídios), quantidade, formato e organização ao longo das hifas (figura 2). Assim, o gênero *Microsporum* caracteriza-se pela presença de numerosos macroconídios de formatos diferentes associados a menor quantidade de microconídios distribuídos ao longo das hifas. Já a identificação microscópica das espécies do gênero *Trichophyton* é caracterizada pela presença de grande quantidade de microconídios arredondados ou piriformes com disposição peculiar nas hifas, associados a poucos macroconídios, divididos por septos finos e transversais, em geral com superfície externa lisa. Por fim, o gênero *Epidermophyton*, de forma ímpar, demonstra a presença exclusiva de macroconídios na forma de clava, divididos por septos finos e com superfície lisa, organizados de forma agrupada, semelhante a um “cacho de bananas” (SIDRIM; ROCHA, 2004, DE HOOG et al., 2015b).

Figura 2. Principais achados micromorfológicos de cada gênero dos dermatófitos.



Fonte: SIDRIM, ROCHA (2004).

Com relação ao *T. tonsurans*, suas colônias, quando inoculadas em ágar Sabouraud, iniciam seu crescimento por volta do 3-5º dias da sementeira primária, atingindo seu completo desenvolvimento após 12-16º dias de incubação (LARONE, 1995; DE HOOG et al., 2015b).

Estas colônias possuem aspecto heterogêneo, com textura variável do algodinoso ao veludoso, e quando essas se tornam mais velhas podem até apresentar colônias do tipo furfurácea (DE HOOG et al., 2015b). Quanto ao relevo, podem apresentar-se apiculadas, crateriformes, ou até mesmo cerebriiformes, com algumas pregas radiais (figura 3A) (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Baseado nessas diferenças de textura, relevo e pigmentação, Guy Badillet (1986) descreveu 4 variedades de *T. tonsurans*: *T. tonsurans* var. *acuminatum*, quando a colônia tem uma pequena apiculação central circunscrita por pregas radiais, *T. tonsurans* var. *cerebriforme*, quando predomina um relevo com aspecto de circunvoluções no centro da colônia, *T. tonsurans* var. *crateriforme*, quando a colônia apresenta uma forte depressão central e por fim, *T. tonsurans* var. *sulfureum*, que mostra uma depressão central associada a um intenso pigmento amarelado.

Em relação à pigmentação, as colônias jovens apresentam pigmentos superficiais suaves, que vão se difundindo pelo meio de cultura e tornando-se mais intensos com o tempo. A coloração do verso é bastante variável, apresentando uma tendência maior a serem brancas (figura 3B) ou em tons variados de bege. O reverso apresenta tons variados de castanho-avermelhado e um pigmento que pode ser difundido em ágar Sabouraud (BADILLET, 1986; SIDRIM; ROCHA 2004; DE HOOG et al., 2015b; PAIXÃO et al., 2020).

O fenômeno do pleomorfismo das colônias de *T. tonsurans* acontece de forma muito lenta, porém, nesse estágio, as características expressas pelas colônias deixam-nas indistinguível dos outros dermatófitos.

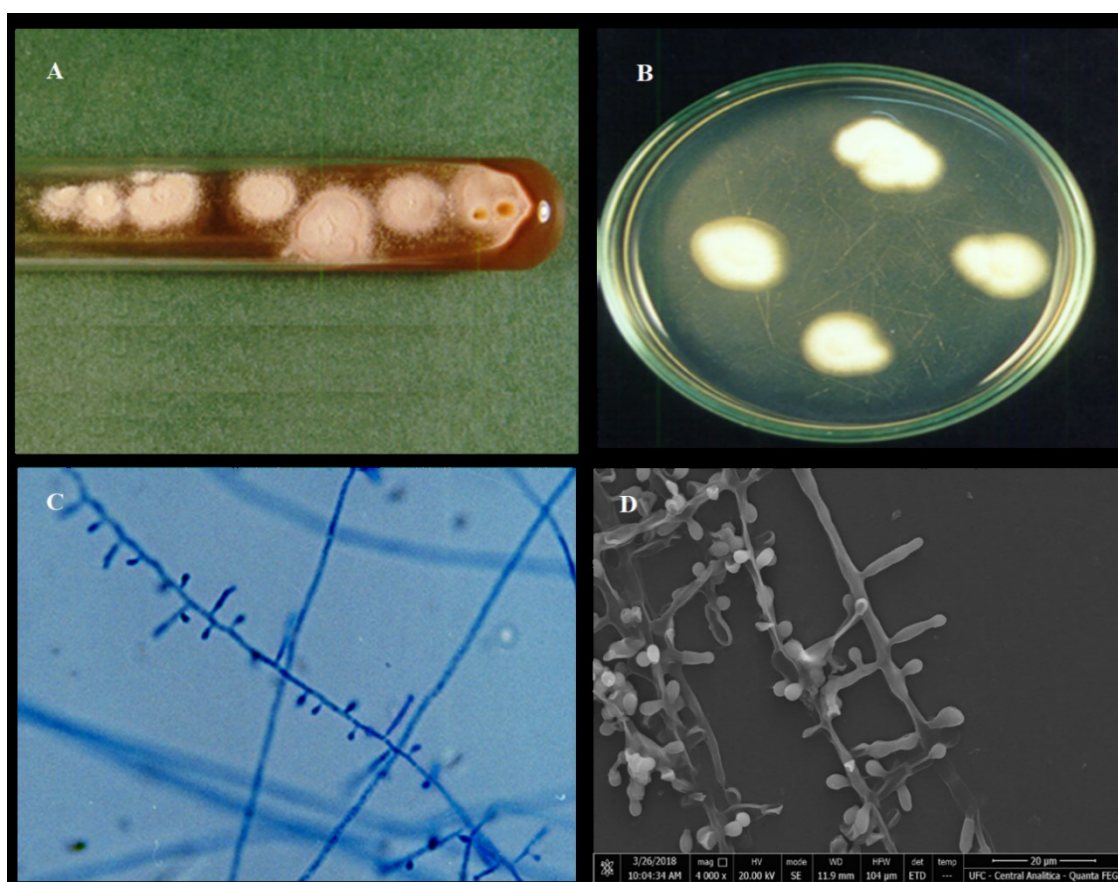
Micromorfológicamente, o *T. tonsurans* se caracteriza pela presença de numerosos microconídios, de forma e tamanhos variáveis, associados a raros macroconídios, de superfície externa lisa e aspecto irregular (DE HOOG et al., 2015b).

Os microconídios, principal estrutura de identificação desse fungo, são pequenos, irregulares (figuras 3C e 3D), hialinos, inicialmente piriformes com tendência de alongar atingindo dimensões de 3 a 6 μm de comprimento por 1,5 a 2 μm de largura (GEORG, 1956b). A implantação desses microconídios ao longo das hifas é inconstante, sendo mais frequente a disposição em forma de *acladium* (figuras 3C e 3D). Porém, algumas cepas mostram microconídios em cachos semelhantes à organização encontrada em *T. mentagrophytes*. Com o passar do tempo, os microconídios vão ficando cada vez mais numerosos, o que confere uma aparência um pouco pulverulenta à superfície da colônia.

Os macroconídios são raros e quando presentes apresentam parede fina, compostos de 3 a 4 células e de tamanho bastante variável, tendo em média 28 μm de comprimento e 10 μm de largura (DE HOOG et al., 2015b).

A presença de raros clamidoconídios terminais e intercalares, hifas em raquete, artroconídios, hifas em espiral e órgãos nodulares pode, ocasionalmente, ser observadas em culturas velhas, mas em pouco ou nada contribuem na identificação final (SIDRIM; ROCHA, 2004; DE HOOG et al., 2015b).

Figura 3. Características macro e micromorfológicas clássicas do *Trichophyton tonsurans*.



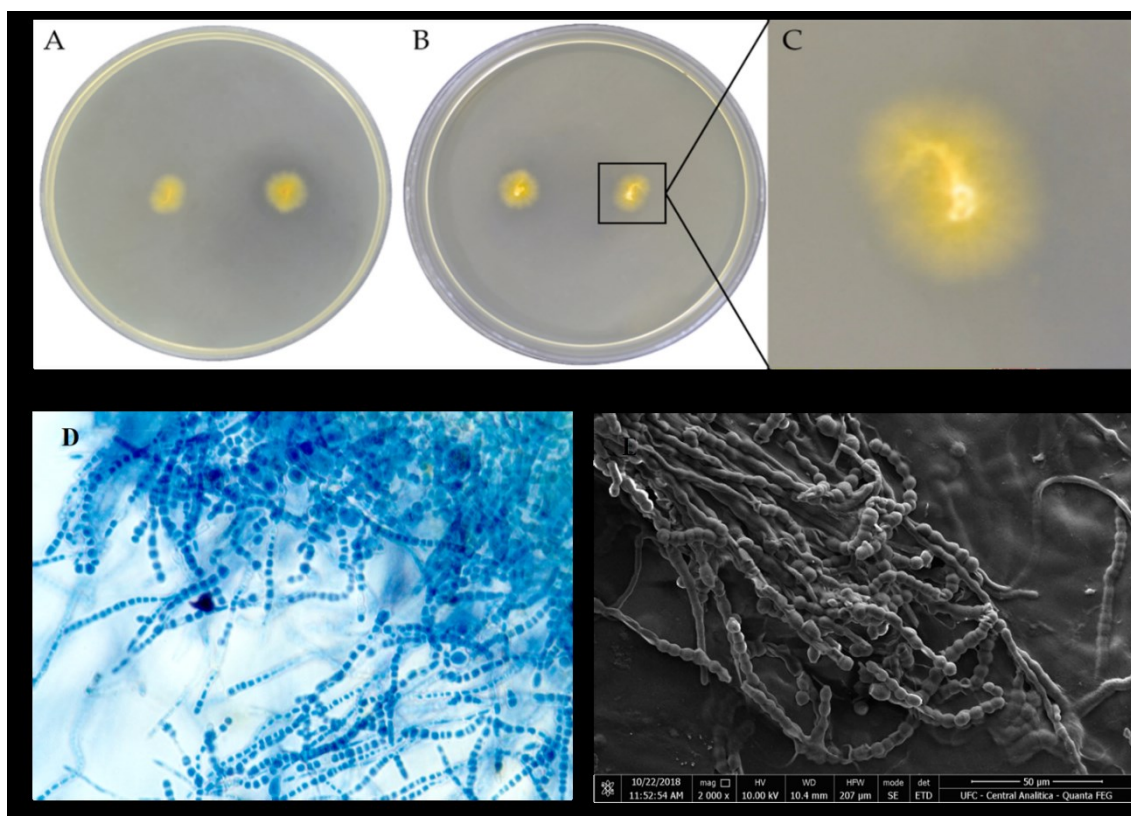
Legenda: A: Colônia semeada tubo com ágar Sabouraud com 15 dias de crescimento a 28 °C. B: Macro colônia semeada em placa com ágar Sabouraud com 15 dias de crescimento a 28 °C. Observar colônia algodonosa branca com discreto micélio aéreo e sem pigmento difusível. C: Microconídios em *acladium*, de tamanhos e formas heterogêneos, montagem de lâmina-lamínula com corante lactofenol azul algodão e aumento de 400X. D: Microconídios em *acladium*, de tamanhos e formas heterogêneos, microcultivo em lamínula Thermanox observada em MEV. Fonte: CEMM, 2020.

Além de aspectos macro e micromorfológicos, outras características úteis para a identificação convencional do *T. tonsurans* são as que repousam nas suas exigências nutricionais e/ou fisiológicas, bem como suas ações enzimáticas.

Sabe-se que, classicamente, o *T. tonsurans* não tem habilidade de perfurar o pelo *in vitro*, à exceção de algumas cepas de *T. tonsurans* var. *sulfureum* (PADHYE et al., 1994), apresenta uma pequena quantidade da enzima urease, não mostra pigmento vermelho em ágar fubá e ágar batata e tem seu crescimento estimulado por tiamina (LARONE, 1995).

No Ceará, o *T. tonsurans*, há pouco mais de duas décadas, vem expressando uma, ainda inexplicada, apresentação morfológica atípica com a produção constante e abundante de clamidoconídios em cadeia (figura 4D e 4E) associada ao desenvolvimento de colônias glabrasas, com pouco micélio aéreo e intenso pigmento amarelo ferrugem (figuras 4A, 4B e 4C), achados esses bastante diferenciados das descrições clássicas de *T. tonsurans*. (BRILHANTE et al., 2000; BRILHANTE et al., 2004; SIDRIM et al., 2013; BRILHANTE et al., 2019; BRILHANTE et al., 2021).

Figura 4. Características macro e micromorfológicas do *Trichophyton tonsurans* produtor de clamidoconídios.



Legenda: A, B: Macro-colônia semeada em ágar Sabouraud com 15 dias de crescimento a 28 °C. Observar colônias glabras, com pouco micélio aéreo e intenso pigmento amarelo ferrugem. C: Destaque da macro-colônia vista nas figuras A e B. D: Clamidoconídios em cadeia, montagem de lâmina-laminula com corante lactofenol azul algodão. Aumento de 400X. E: Clamidoconídio em cadeia, Microcultivo em lamínula Thermanox observada em MEV. Fonte: CEMM, 2020.

Clamidoconídios são estruturas produzidas assexuadamente, decorrentes da diferenciação de um segmento de hifa (KIMURA et al., 2012). Variam de globosos a ovoides e podem se localizar de forma intercalar ou terminal ao longo das hifas. Possuem paredes espessas e citoplasma condensado, apresentando maior resistência aos fatores externos e sendo, portanto, considerados estruturas de resistência fúngica (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Essas microestruturas são comuns em algumas leveduras como *Candida albicans*, desde que tenham a produção estimulada por meios de cultura específicos como o ágar cornmeal com Tween 80, e em algumas espécies de *Mucorales*, não possuindo valor taxonômico nas chaves de classificação dos dermatófitos, exceto para o *Trichophyton concentricum* e *Trichophyton verrucosum*, onde o achado dessas estruturas é comum (DE HOOG et al., 2015b).

Morfologicamente, os clamidoconídios devem ser diferenciados de fragmentos de hifas degeneradas, artroconídios e até mesmo esférulas imaturas de *Coccidioides immitis* (KIMURA et al., 2012).

Isto posto e considerando que os clamidoconídios não são estruturas associadas à identificação e diferenciação de *T. tonsurans*, a observação da produção consistente e abundante dos mesmos em cepas de *T. tonsurans* isoladas no Ceará, conduz para a necessidade de revisão nos critérios taxonômicos dessa espécie dermatofítica.

Em 2013, Mochizukit et al. propuseram a identificação presuntiva de *T. tonsurans* baseada na observação de estruturas ovoides, medindo entre 7-10 µm semelhantes a clamidoconídios intercalares, no entanto não descreveram outras alterações na morfologia das colônias e nem lançaram luz sobre a motivação da produção dessas estruturas particulares pelo *T. tonsurans*.

2.6 Identificação molecular e proteica dos dermatófitos

Tradicionalmente, os dermatófitos ainda são identificados com base em sintomas clínicos, características morfológicas *in vitro* e no comportamento fisiológico das

espécies (CAFARCHIA et al., 2013, DE HOOG et al., 2017; BAERT et al., 2020). Não obstante, a instabilidade fenotípica aliada a plasticidade microbiana apresentada por algumas espécies pode produzir classificações errôneas e superdimensionadas, com proposição inadequada de novas espécies e/ou variedades, fazendo com que a identificação desses fungos permaneça desafiadora, mesmo para micologistas mais experientes.

Por conseguinte, a identificação dos dermatófitos baseada em características morfológicas e fenotípicas apresenta limitações e não deve mais ser usada como único critério taxonômico, sendo altamente desejável a combinação de diferentes abordagens, incluindo o estudo dos perfis genotípico e proteico (DE HOOG et al., 2015a; GRASER et al., 2018; GOSTINČAR, 2020).

O diagnóstico molecular dos dermatófitos está diretamente relacionado aos procedimentos de extração e sequenciamento do DNA e, muito embora, as técnicas biomoleculares tenham evoluído bastante, ainda carecem de consenso. Ademais, o fato de que a classificação fenotípica das espécies dermatofíticas nem sempre se traduzem em entidades taxonômicas moleculares distintas, ainda se configura num desafio para a popularização de métodos moleculares nos laboratórios de *micologia* médica (GRASER et al., 1999; SUMMERBELL et al., 2007; SUH; GROSSO; CARRION, 2018).

Os principais métodos moleculares são divididos em PCR convencional e PCR em tempo real e variam de acordo com métodos de extração de DNA, *primers* direcionados e o modo de analisar os produtos de PCR. Os primeiros estudos moleculares voltados para identificação fúngica utilizavam subunidades ribossômicas pequenas e marcadores grandes e inespecíficos, o que impossibilitava diagnósticos assertivos em nível de espécie. Para superar essas dificuldades iniciais, o sequenciamento de regiões mais específicas de rDNA tais como região D1-D2, beta- tubulina e proteína L-10 ribossomal são cada vez mais comuns e revelam resultados mais precisos (REZAI-MATEKKOLAI et al., 2014; DE HOOG et al., 2017).

Avanços recentes forneceram novas técnicas para identificar os dermatófitos, incluindo suas variações intraespecíficas. A subtipagem intraespecífica e a diferenciação de cepas torna possível o rastreamento de infecções, a identificação de fontes comuns de infecção, recorrência ou reinfecção após tratamento e análise da virulência de cepas e resistência a drogas. Dentre os principais métodos moleculares de subtipagem intraespecífica e diferenciação de cepas de dermatófitos, destacam-se a análise de DNA

mitocondrial e genes RNA ribossômico não transcrito, amplificação randomizada de DNA polimórfico e marcadores de microssatélite (VERRIER; MONOD, 2017).

Algumas técnicas moleculares são úteis para compreender as relações filogenéticas entre taxa de dermatófitos, dentre elas fragmento de restrição análise do comprimento de polimorfismo (RFLP) de mitocôndrias (mt) DNA, amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) usando *primers* arbitrários e análise sequencial de genes com funções específicas, como genes de RNA ribossômico (rDNA), genes que codificam a quitina sintase I, DNA topoisomerase II e beta-tubulina (VINGTARAMIN et al., 2019). Isso resultou em novas classificações de dermatófitos, incluindo reconstruções filogenéticas baseadas em sequência de nucleotídeos de espaçadores internos transcritos (ITS) de rDNA e foi descoberto que essas classificações geralmente corroboram com os traços clínicos e ecológicos característicos dessas cepas. Logo, a atual abordagem padrão-ouro para a identificação de isolados de dermatófitos é a análise do código de barras da sequência ITS (IRINYI et al., 2015).

No que se refere ao conhecimento do perfil proteico dos fungos e sua utilização para a identificação, observa-se que, ao longo da última década, a espectrometria de massa de tempo de voo de dessorção/ionização assistida por matriz (MALDI-TOF) vem permitindo a identificação rápida e precisa de muitos microrganismos. O MALDI-TOF foi primeiramente adaptado para a identificação de bactérias (SENG et al., 2010) e posteriormente ajustado para leveduras (MARKLEI et al., 2009; VAN VENN; CLASS; KUIJPER, 2010). Recentemente, esforços combinados de várias equipes de pesquisadores demonstraram que essa técnica também poderia ser adaptada com sucesso à identificação de fungos filamentosos, desde que bibliotecas de espectro de referência adequadas fossem estabelecidas e disponibilizadas para laboratórios de rotina. (RANQUE et al., 2014; CASSAGNE et al., 2016; L'OLLIVIER, RANQUE, 2017).

Esse método visa analisar o perfil proteico dos microrganismos e comparar cada espectro de massa obtido com os espectros de massa de referência presentes em bancos de dados, utilizando uma abordagem de correspondência de padrões, a qual se baseia em análises estatísticas multi-variantes e inclui posições de pico e intensidade (L'OLLIVIER, RANQUE, 2017). O MALDI-TOF detecta os pesos moleculares das proteínas em uma faixa de massa entre 2 e 20 kDa, representando principalmente proteínas ribossômicas (NENOFF et al., 2013). A tecnologia de MALDI-TOF é projetada para fornecer uma impressão digital espectral de massa característica, com base em íons de proteína dessorvidos das células e essa impressão digital característica da

proteína de um microrganismo em particular é usada para identificá-lo, combinando com padrões de proteína específicos da espécie, incluídos em uma biblioteca abrangente de espectros de referência (MURRAY, 2012., NENOFF et al., 2013). Assim, a identidade de um microrganismo pode ser estabelecida em nível do gênero e, em muitos casos, em nível de espécies e de linhagens (KARABIÇAK et al., 2015).

Entre 2008 e 2015, alguns estudos abordaram a precisão da identificação dos dermatófitos utilizando MALDI-TOF, com resultados variando entre 13,5 e 100%. Essa variabilidade deveu-se, em parte, a inconsistências relativas a etapas críticas do processo laboratorial clínico de rotina (ERHARD et al., 2008; L'OLIVIER et al., 2013; NENOFF et al., 2013; CALDERARO et al., 2014; KARABIÇAK et al., 2015; L'OLLIVIER; RANQUE, 2017).

Atualmente, quatro diferentes plataformas de identificação de bancada MALDI-TOF estão disponíveis no mercado: o Andromas (Andromas SAS, Paris, França), o MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha), o Axima @ Saramis (Shimadzu/AnagnosTec, Duisburg, Alemanha) e o Vitek MS (bioMérieux, Marcy-l'étoile, França) e embora funcionem com diferentes instrumentos fabricados por três empresas: Bruker Daltonics, Scientific Analysis Instrument (Manchester, Reino Unido) e Shimadzu (Tóquio, Japão), essas plataformas compartilham métodos analíticos muito semelhantes (L'OLLIVIER; RANQUE, 2017).

Mesmo com a espectrometria de massa MALDI-TOF se caracterizando como uma ferramenta poderosa no contexto da microbiologia clínica, permitindo identificação rápida para bactérias e leveduras, seu uso para fins diagnósticos para os dermatófitos ainda precisa de maiores avanços, em parte devido à falta de definição clara de espécies para alguns taxa ou alguns complexos de espécies e também à escassez de perfis proteicos desses fungos depositados em bancos de dados de referência, como demonstram os estudos realizados por De Respini et al. (2014), que ao analisar alguns espectros de *T. tonsurans* por MALDI-TOF, os mesmos foram identificados erroneamente como *T. interdigitale*.

Pondera-se ainda que a maioria dos estudos genéticos desenvolvidos no grupamento dos dermatófitos, traz como modelos experimentais apenas as espécies *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (KUPSCH et al., 2016; AHMADI et al., 2015; MOCHIZUKI et al., 2017; KOC et al., 2017) sendo os estudos com *T. tonsurans* ainda escassos e inconsistentes.

2.7 Biofilmes como fator de virulência de dermatófitos

Os fungos são capazes de sobreviver em uma ampla gama de hospedeiros, provavelmente porque possuem propriedades estruturais e fisiológicas que lhes conferem a versatilidade necessária para explorar uma variada possibilidade de fontes de nutrientes (ABDEL-RAHMAN et al., 2008). Fungos restritos a uma estreita faixa de hospedeiros, provavelmente refinaram algumas características ancestrais e/ou desenvolveram novas estratégias que permitem a infecção em um número menor de hospedeiros (KNOGGE, 1998).

Para um patógeno prioritariamente humano como o *T. tonsurans*, a capacidade das cepas em estabelecer infecções em diferentes microambientes e promover graus variados de inflamação, bem como respostas inesperadas frente aos antifúngicos utilizados na prática clínica, pode refletir diretamente a atuação de seus fatores de virulência ou em sua capacidade de induzir expressão gênica em resposta a estímulos ambientais (ABDEL-RAHMAN et al., 2008).

Embora vários fatores relacionados ao hospedeiro criem as condições para o desenvolvimento de dermatofitose, os fatores de virulência inerentes aos dermatófitos também devem estar presentes para que ocorra uma infecção (NENOFF et al., 2014).

Mais recentemente, especial atenção vem sendo dedicada aos biofilmes como fator de virulência na patogenia de infecções humanas causadas por bactérias, leveduras e fungos filamentosos (TRENTIN et al., 2013). Acredita-se que cerca de 65% dessas infecções envolvem microrganismos integrados em comunidades que aderem às superfícies ou interfaces, envoltas por uma densa matriz exo-polissacarídica, nomeadas de biofilmes (VASANTHI et al., 2014; NARAYANA; SRIHARI, 2019).

Os biofilmes foram descritos pela primeira vez pelo holandês Antonie van Leeuwenhoek, que viveu entre 1632 e 1723, mas a teoria que descreve o processo de biofilme não foi desenvolvida até 1978 (DONLON; COSTERTON, 2002). Esta teoria afirma que a maioria das bactérias cresce em biofilmes fechados por matriz aderente a superfícies em todos os ecossistemas aquáticos suficientes em nutrientes e que essas células bacterianas sésseis diferem profundamente de suas formas planctônicas (DONLON; COSTERTON, 2002).

A definição de biofilmes vem evoluindo bastante e na atualidade, o conceito de biofilme considera não apenas características prontamente observáveis, ou seja, células ligadas a uma superfície ou interface, embutidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares que essas células produziram, incluindo os componentes não

celulares ou abióticos, mas também outros atributos fisiológicos desses organismos, tais como características de taxa de crescimento alterada e o fato de que organismos de biofilme transcrevem genes que organismos planctônicos não transcrevem (DONLON; COSTERTON, 2002; GUPTA et al., 2016; ALGBURI et al., 2017).

O biofilme é um modo de vida empregado por muitos microrganismos patogênicos e ambientais para proliferar como agregados multicelulares em substratos inanimados ou biológicos inertes e várias infecções microbianas têm sido associadas à formação de biofilme, representando desafios nos esquemas de tratamento (SAXENA et al., 2019).

O processo de desenvolvimento de biofilme pode ser dividido em quatro fases: fixação (na superfície, inanimado ou tecido), fase de crescimento sésil governada por interação intercelular (fatores de detecção de quórum), maturação de biofilme (síntese da matriz de substâncias exopoliméricas induzidas) e dispersão (indução de fatores de desmontagem) (FLEMMING et al., 2016; JAMAL et al., 2018).

Acredita-se que a formação de biofilme pode conferir aos microrganismos envolvidos, proteção contra adversidades do ambiente, resistência a estresses físicos e químicos, cooperação metabólica e regulação da expressão gênica baseada na comunidade (RAMAGE et al., 2012; STEWART et al., 2019). Autores como ALGBURI et al. 2017 defendem que até 80% dos patógenos que formam biofilmes estão associados a infecções persistentes.

Ainda que a maioria dos trabalhos com biofilmes se refiram à biofilmes bacterianos e de leveduras, cada vez mais constata-se que os fungos dimórficos e filamentosos, dentre eles os dermatófitos, também formam biofilmes (CORDEIRO et al., 2015; BRILHANTE et al., 2015; MLYNÁRIKOVÁ et al., 2016; BRILHANTE et al., 2017).

A primeira descrição do papel dos biofilmes na dermatofitose, foi feita por Burkhart et al. 2002 e sugere que os dermatófitos são capazes de formar biofilmes *in vivo*, o que justificaria a presença de elementos fúngicos vivos, como hifas e artroconídios, nos diferentes tecidos queratinizados, podendo resultar em dificuldade de remoção cirúrgica (no caso de dermatofitomas) e resistência às terapias tradicionais (TRENTIN et al., 2013). A partir de então, algumas pesquisas vêm sendo publicadas demonstrando a formação, arquitetura e sensibilidade de biofilmes em dermatófitos (COSTA-ORLANDI et al., 2014; DOS SANTOS; DIAS-SOUZA, 2017; BRILHANTE et al., 2017).

Um fator que vem sendo investigado no processo de formação de biofilmes é o papel das moléculas de *quorum sensing*. A detecção de *quorum*, uma forma de comunicação molecular em comunidades microbianas, é relativamente bem estudada em espécies bacterianas, mas pouco compreendida em fungos.

Farnesol, uma molécula de detecção de *quorum* secretada por *C. albicans*, foi a primeira molécula de detecção de *quorum* descrita em um organismo eucariótico (WONGSUK; PUMESAT; LUPLERTLOP, 2016). Essa molécula pode ser encontrada sendo sintetizada endogenamente pelas células de *C. albicans* por desfosforilação enzimática do farnesil pirofosfato, precursor da síntese de esteróis. Estudos anteriores descreveram a atividade antimicrobiana do farnesol em bactérias, como *Burkholderia pseudomallei* (CASTELO-BRANCO et al., 2016) e *Staphylococcus* spp. (CERCA et al., 2012), bem como em alguns fungos, como *C. albicans* (XIA et al., 2017), *Aspergillus flavus* (WANG et al., 2014), *Trichosporon inkin* e *Trichosporon asahii* (CORDEIRO et al., 2019), *Coccidioides posadasii* (BRILHANTE et al., 2013). Os relatos dos efeitos do farnesol sobre biofilmes vem aumentando e já foi descrito que este influencia na formação de biofilmes de várias espécies fúngicas (BRILHANTE et al., 2015; WONGSUK; PUMESAT; LUPLERTLOP, 2016; CORDEIRO et al., 2019).

Vários estudos comprovam que o farnesol atua controlando a morfogênese de *Candida albicans* por inibição da filamentação desse patógeno (POLKE et al., 2017; RAMAGE et al., 2012), porém, esse feito parece não ser comum para outros fungos, sendo apontado mecanismos diversos de atuação dessa molécula, de tal sorte que seu modo preciso de ação ainda não é conhecido.

2.8 Tratamento da *tinea capitis*

Uma variedade de agentes antifúngicos orais e tópicos está disponível para o tratamento de infecções fúngicas superficiais causadas por dermatófitos, dentre eles, os imidazóis (como clotrimazol, miconazol), os triazóis (como fluconazol, itraconazol e efinaconazol), as alilaminas (como terbinafina e naftifina) e a griseofulvina. Sabe-se que o tratamento é guiado pela espécie envolvida, idealmente associando-se agentes sistêmicos a tratamentos tópicos adjuvantes (GUPTA et al., 2017).

Em geral, todos os antifúngicos sistêmicos são significativamente mais eficazes no tratamento das espécies que produzem parasitismo piloso endotrix quando comparado às infecções do tipo ectotrix (MAYSER et al., 2020).

Tradicionalmente, a griseofulvina é o medicamento mais amplamente prescrito para o tratamento de *tinea capitis*, especialmente em crianças, pois é uma das abordagens mais econômicas e acessíveis (GUPTA et al., 2013). Seu uso como tratamento de escolha para essa infecção se iniciou em 1958 na América do Norte e permaneceu popular por décadas. A griseofulvina é fungistática e age interferindo na mitose pela ligação com os microtúbulos fúngicos. É rapidamente eliminada do corpo, por isso deve ser administrada continuamente por um longo período de tempo para ser eficaz. Essa maior duração do tratamento pode contribuir para um nível mais alto de eventos adversos quando comparado com o uso de outros agentes antifúngicos além do que são necessárias dosagens mais altas de griseofulvina para infecções com parasitismo piloso do tipo endotrix, fato que pode contribuir para a redução da adesão do paciente e diminuição da eficácia do referido medicamento (GUPTA et al., 2018).

Nos últimos anos, outros agentes antifúngicos com destaque para a terbinafina vêm sendo cada vez mais utilizados no tratamento da *tinea capitis* (RADEMARK, HAVILL, 1998; FLEECE; GAUGHAN; ARONOFF, 2004; GONZALEZ et al., 2007; TEY, TAN, CHAN, 2011). A terbinafina foi introduzida pela primeira vez no mercado dos Estados Unidos como tratamento para onicomicose na década de 1990 e, em seguida, começou a ser usada também no tratamento da *tinea capitis* (GUPTA et al., 2013).

A terbinafina é um antifúngico sintético da classe alilamina, que atua inibindo seletivamente a enzima esqualeno epoxidase, que está envolvida na síntese do ergosterol. É comercializada em formulações tópicas e sistêmicas, é uma droga altamente lipofílica e queratofílica, o que vem tornando-a droga de escolha na terapia das dermatofitoses, pois é bem tolerada e tem um potencial relativamente baixo de interações medicamentosas (GIANNI, 2010).

Uma série de ensaios clínicos comparando griseofulvina e terbinafina foram publicados, e descrevem resultados mistos quanto à superioridade (RADEMARK, HAVILL, 1998; FLEECE; GAUGHAN; ARONOFF, 2004; GONZALEZ et al., 2007; TEY, TAN, CHAN, 2011), mas embora essas análises não tenham conseguido detectar diferença estatística significativa entre esses dois medicamentos, vários estudos mostram que a terbinafina é mais eficaz para *Trichophyton* spp. e griseofulvina para *Microsporum* spp. (GUPTA et al., 2013).

Ansari et al. em 2016, caracterizaram a susceptibilidade antifúngica *in vitro* de 316 isolados clínicos de dermatófitos e revelou que a terbinafina foi o antifúngico mais

potente contra todos os isolados, com uma faixa de MIC de 0,002-0,25 µg/mL, seguida por itraconazol (0,004-0,5 µg/mL), griseofulvina (0,125-8 µg/mL) e fluconazol (4-128 µg/mL).

Cheng et al. publicaram em 2017 uma revisão sobre a terapia antifúngica sistêmica para *tinea capitis* em crianças e postularam que a griseofulvina e a terbinafina são eficazes. No entanto, a terbinafina é mais eficaz para *T. tonsurans* e a griseofulvina para infecções por *M. canis*. Itraconazol e fluconazol são alternativas farmacológicas, mas não escolhas ideais para infecções por *Trichophyton* sp.

Gupta et al. em 2018, realizaram uma busca sistemática na literatura de artigos disponíveis usando as bases de dados PubMed, OVID, Cochrane Libraries e ClinicalTrials.gov e encontraram 21 ensaios randomizados e 17 ensaios não randomizados, avaliando as diferentes terapias antifúngicas (orais e combinações das mesmas). Itraconazol contínuo e terbinafina tiveram as maiores taxas de cura micológica (79% e 81%, respectivamente), griseofulvina e terbinafina tiveram as maiores taxas de cura clínica (46% e 58%, respectivamente) e griseofulvina e terbinafina tiveram a maior taxa de cura completa (72% e 92%, respectivamente).

Com base na maioria dos estudos, a terbinafina é um fármaco de primeira linha, bem tolerado e eficaz, sendo a preferida em casos de *tinea capitis* causada por espécies de *Trichophyton*, enquanto que a griseofulvina e o itraconazol são mais indicados para os casos envolvendo espécies de *Microsporum* e *Nannizia* (MIKAEILI et al., 2019; CHENG et al., 2017; ELEWSKI et al., 2008; MAYSER et al., 2020).

3 HIPÓTESES

1. *Trichophyton tonsurans* produtor de clamidoconídios tem perfil proteico diferente das cepas padrão de *T. tonsurans*;
2. *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios tem perfil genético diferente das cepas padrão de *T. tonsurans*;
3. O perfil de sensibilidade a terbinafina de *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios é semelhante ao das cepas padrão de *T. tonsurans*;
4. *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios é capaz de formar biofilmes *in vitro*;
5. O farnesol tem ação contra biofilmes de *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Conhecer o perfil proteico e genético do *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios, bem como sua capacidade de formação de biofilmes *in vitro* e sensibilidade à terbinafina e à molécula *quorum sensing* farnesol.

4.2 Objetivos específicos

- Conhecer o perfil proteico das cepas de *T. tonsurans* produtoras de clamidoconídio por meio do MALDI-TOF;
- Caracterizar o perfil genético e a filogenia do *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios considerando as regiões dos loci de *ITS* e *LSU* do DNA ribossomal e o gene da β -tubulina parcial;
- Investigar a capacidade de formação de biofilme das cepas de *T. tonsurans* produtoras de clamidoconídios *in vitro*;
- Determinar a sensibilidade de biofilmes de *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios frente a terbinafina e ao farnesol;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local de estudo

As pesquisas foram realizadas nos laboratórios do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), na Central analítica da UFC para obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura e do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), na obtenção dos perfis proteicos.

5.2 Caracterização morfológica e seleção dos microrganismos utilizados no estudo

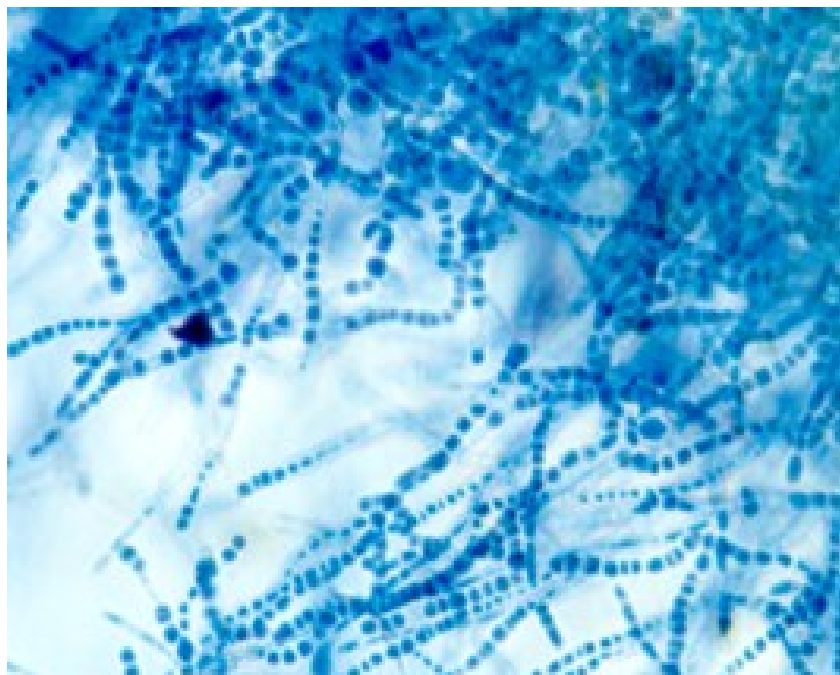
A caracterização morfológica das cepas utilizadas no presente estudo foi baseada em critérios fenotípicos macroscópicos e microscópicos.

Inicialmente, foram analisadas 82 cepas de *T. tonsurans* isoladas de lesões de *tinea capitis* estocadas na micoteca do CEMM. As amostras foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (SDA), ágar Sabouraud com cloranfenicol (SCA) e ágar Mycosel (MYC) e incubadas a 28°C por até 20 dias. Logo após a detecção visual do crescimento das colônias, e por meio de preparações lâmina-lamínula com o corante lactofenol azul algodão (figura 5), procedeu-se à quantificação dos clamidoconídios por dois observadores independentes e as cepas foram categorizadas em dois grupos: grupo 1- cepas com ≤ 5 clamidoconídios por campo e grupo 2- cepas com, pelo menos, uma cadeia de clamidoconídios formada por > 5 clamidoconídios por campo.

52/82 cepas (63,41%) foram classificadas no grupo 2. Destas, 18/52 (34,62%) apresentaram até 1 cadeia formada por > 5 clamidoconídios/campo, 24/52 cepas (46,15%) produziram entre 2 e 5 cadeias de clamidoconídios/campo e 10/52 cepas (19,23%) produziram > 6 cadeias de clamidoconídios/campo.

Foram selecionadas as 10 cepas que produziram > 6 cadeias de clamidoconídios/campo e aprofundou-se a análise das características morfológicas. Para tanto, essas cepas foram inoculadas em SDA, SCA ou MYC e incubadas a 28 °C por até 20 dias. Tamanho, margens, textura, relevo e pigmentação das colônias foram definidos de acordo com De Hoog et al. (2015b) e SIDRIM; ROCHA (2004).

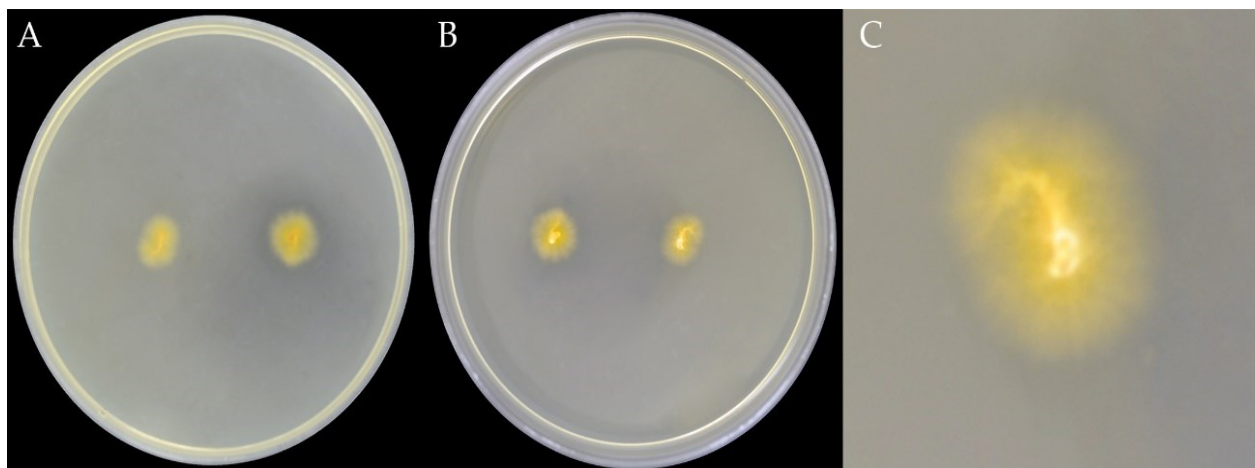
Figura 5. Cadeias de clamidoconídios observadas em *Trichophyton tonsurans*.



Legenda: Clamidoconídios em cadeia, montagem de lâmina-lamínula com corante lactofenol azul algodão. Aumento de 400X. Fonte: CEMM, 2020.

Todas as cepas apresentaram colônias pequenas (menores que 1 cm de diâmetro), de textura glabrosa, com pouco desenvolvimento de micélio aéreo e intenso pigmento cor amarelo-ferrugem (figura 6), que permaneceram inalteradas até o 20º dia de observação.

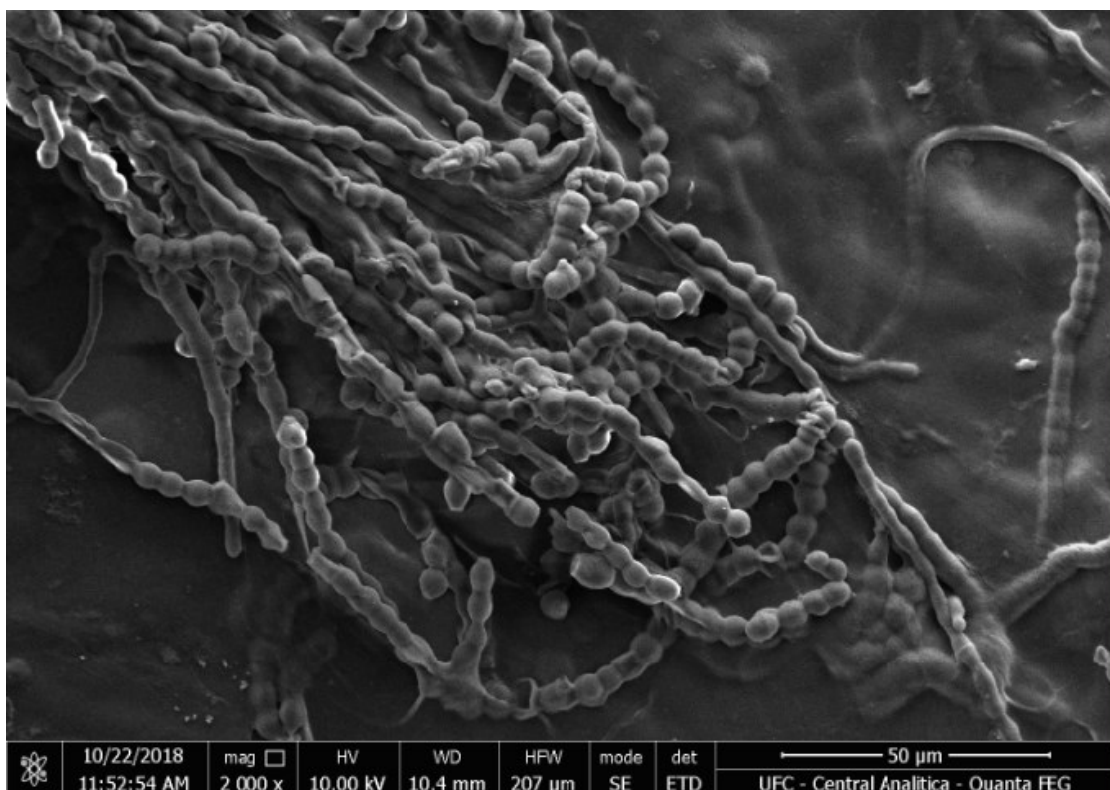
Figura 6. Macrocolônia de *Trichophyton tonsurans* produtor de clamidoconídios.



Legenda: A, B: Macro-colônia semeada em placa de ágar Sabouraud com 15 dias de crescimento a 28 °C. Observar colônias glabras, com pouco micélio aéreo e intenso pigmento amarelo ferrugem. C: Destaque da macrocolônia vista nas figuras A e B. Fonte: CEMM, 2020.

As estruturas microscópicas foram observadas diariamente do 5º ao 15º dia e no 20º dia de crescimento. Uma análise mais detalhada dos clamidoconídios (figura 7) foi realizada por microscopia eletrônica de varredura, com fragmentos da colônia de *T. tonsurans* colocados em lamínulas Thermanox™ (Thermo Fisher Scientific, NY, EUA) e processados, conforme descrito por Brilhante et al.,2016. As lamínulas foram observadas com um microscópio eletrônico de varredura Quanta 450-FEG, no modo de alto vácuo a 20 kV (BRILHANTE et al., 2019).

Figura 7. Microcultivo de *Trichophyton tonsurans* em lamínulas Thermanox™ TM.



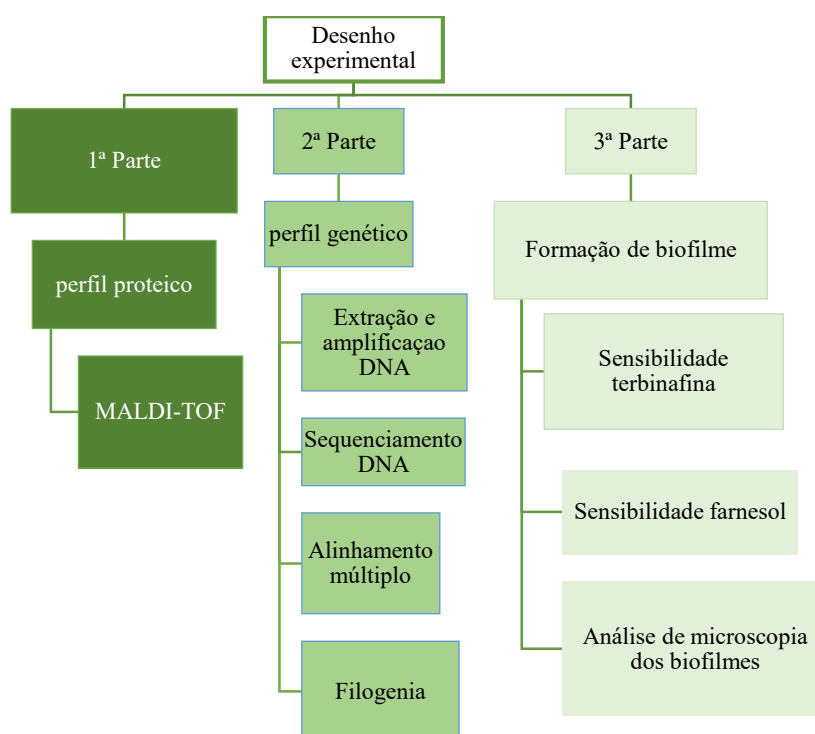
Legenda: Clamidoconídios em cadeia. Microcultivo em lamínula Thermanox observada em MEV. Fonte: CEMM, 2020.

Por fim, selecionamos as 06 cepas de *T. tonsurans* com maior produção de clamidoconídios (CEMM-01-3-089, CEMM-01-3-090, CEMM-01-3-091, CEMM-01-3-092, CEMM-01-3-093 e CEMM-01-3-094), as quais juntamente com 01 cepa padrão *T. tonsurans* ATCC 28942, compuseram os microrganismos selecionados para o presente estudo.

5.3 Desenho experimental

Este trabalho foi organizado em três etapas conforme figura 8. 1) investigação do perfil proteico do *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios, 2) análise do perfil genético e 3) investigação do efeito da terbinafina e do farnesol sobre a biomassa e a atividade metabólica de biofilme desse dermatófito, com a análise da microscopia dos mesmos por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal.

Figura 8 – Fluxograma de execução do trabalho.



A 1ª parte consistiu na investigação do perfil proteico do *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. A 2ª parte analisou o perfil genético e na 3ª parte investigou-se o efeito da terbinafina e do farnesol sobre a biomassa e a atividade metabólica de biofilme desse dermatófito, com a análise da microscopia dos mesmos por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal.

5.4 Análise do perfil proteico

O perfil proteico das cepas CEMM 01-3-089, CEMM 01-3-090 e CEMM 01-3-091 e *Trichophyton tonsurans* padrão ATCC 28941 foi investigado por espectrometria de massa de tempo de voo de dessorção/ionização assistida por matriz (MALDI-TOF MS).

A identificação das amostras foi confirmada com 03 *Main Spectra Profile* (MPS) de *T. tonsurans* (*T. tonsurans* RV491, *T. tonsurans* 28 VML e *T. tonsurans* VML) existentes na biblioteca do MALDI Biotyper versão 3.0/Bruker e que não estão disponíveis comercialmente.

Os escores ou valores de corte de identificação ≥ 2.000 indicam identificação segura em nível de espécie, escores de 1.700-1.999 indicam identificação segura em nível de gênero e escores de < 1.700 são classificados como não confiáveis (Li et al., 2017). Todos os isolados testados apresentaram valores de corte de identificação (escore) acima de 1.9, indicando identificação segura do gênero e provável identificação da espécie. As análises foram feitas em triplicata, o que garante segurança na identificação.

As cepas foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose a 28° C por 15 dias. Os perfis proteicos foram obtidos antes do processo de extração proteica prévia por avaliação direta da massa celular, e após extração proteica com ácido fórmico e acetonitrila, com a avaliação do sobrenadante proteico, seguindo protocolo recomendado pela Bruker Daltonics. As comparações dos planos espectrais foram realizadas visualmente nos Softwares FlexAnalysis (Bruker) e Open Source Mass Spectrometry Tool (HEDAYATI et al., 2019; L'OLLIVIER et al., 2013; CALDERARO et al., 2014).

5.5 Análise do perfil genético

5.5.1 Extração e amplificação do DNA

Para a extração do DNA total., as cepas (CEMM-01-3-089, CEMM-01-3-090, CEMM-01-3-091 e *T. tonsurans* padrão ATCC 28942) foram cultivadas previamente em YEPD caldo (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose) sob agitação de 100 rpm a temperatura ambiente por 7 dias. Após o período de incubação, colônias foram retiradas do caldo e lavadas com água Milli-Q e o DNA total foi extraído e purificado utilizando o *MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit* (Epicentre), seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi estocado em freezer -20 °C até o momento do uso.

Utilizando a técnica de PCR, amplificou-se as regiões dos loci de *ITS* e *LSU* de rDNA e o gene da β -tubulina parcial., utilizando os seguintes *primers*: Região *ITS1-5.8-ITS2* do rDNA: *primers ITS5* (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e *ITS4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'); Região *D1-D2* da LSU do rDNA: *primers LR0R* (5'-GTACCCGCTGAACTTAAGC-3') e *LR5* (5'-ATCCTGAGGGAACTTC-3'); e β -tubulina parcial (*TUB*): *primers TUB2Fd* (5'-GTBCACCTYCARACCGGYCARTG-

3') e *TUB4Fd* (5'- CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC-3'). Em seguida realizado PCR de acordo com o protocolo estabelecido por De Hoog et al. (2017), com modificações. Para o preparo do *mix*, 2 µl de DNA extraído foi adicionado a uma solução contendo 5 µl de tampão 5X, 2,6 µl de cloreto de magnésio (MgCl₂), 5,5 µl de água ultrapura, 2,5 µl de cada primer (1 par por reação), 5 µl de dNTP e 0,05 µl de Taq polimerase, atingindo um volume final de 25 µl. A amplificação foi realizada seguindo as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, anelamento em temperatura determinada para cada par de *primer*, e 72 °C por 60 segundos, seguidos de uma extensão final de 72 °C por 7 minutos. Após a amplificação, os *amplicons* foram observados através eletroforese em gel de agarose a 2%. Após a amplificação, o DNA foi quantificado através do fluorômetro Qubit® (Life Technologies, EUA), utilizando o *Qubit™ dsDNA BR Assay Kit* (Life Technologies, EUA), conforme as instruções do fabricante.

5.5.2 Sequenciamento do DNA e busca de sequências similares

As regiões amplificadas foram enviadas para a ACTgene (RS, Brasil) para o sequenciamento por meio da plataforma AB 3.5000. O tamanho das sequências obtidas foi de 700-800 nucleotídeos e disponibilizados na forma de eletroferogramas (arquivo ab1), que representam o real resultado da separação de fragmentos de DNA pela eletroforese capilar. Os eletroferogramas foram abertos com o programa BioEdit (HALL, 1999) para edição das sequências. Após a edição, as sequências foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando a ferramenta de busca e alinhamento BLAST (ALTSCHUL et al., 1990).

As sequências se assemelharam em 100% com o acesso AF170476.1 confirmando a identificação molecular do *T. tonsurans*. Todas as sequências foram depositadas no Genbank (números de acesso na Tabela 1).

Tabela 1: Sequências gênicas de *Trichophyton tonsurans* produtor de clamidoconídios depositadas no GenBank.

| <i>T. tonsurans</i> | Número de acesso Genbank | | | Origem |
|---------------------|--------------------------|------------|------------|--------|
| | <i>ITS</i> | <i>LSU</i> | <i>TUB</i> | |
| CEMM-01-3-089 | MN704385.1 | MN707947.1 | MN714009.1 | Brasil |

| | | | | |
|---------------|------------|------------|------------|------------|
| CEMM-01-3-090 | MN704386.1 | MN707948.1 | MN714010.1 | Brasil |
| CEMM-01-3-091 | MN704387.1 | MN707949.1 | MN714011.1 | Brasil |
| ATCC 28942 | MN704388.1 | MN707950.1 | MN714012.1 | Inglaterra |

5.5.3 Alinhamento múltiplo e análise filogenética

Para a construção dos dendrogramas, sequências genéticas dos *loci ITS* e *LSU* e gene *TUB* de 15 cepas de *T. tonsurans*, 03 cepas de *Trichophyton equinum* (espécie taxonomicamente próxima a *T. tonsurans*), 01 cepa de *Trichophyton interdigitale* e 01 cepa de *Trichophyton mentagrophytes* isoladas de diferentes regiões geográficas foram recuperadas banco de dados GenBank (Tabela 2) e juntamente com as sequências obtidas das 03 cepas clínicas (CEMM-01-3-089, CEMM-01-3-090, CEMM-01-3-091) e 01 cepa *T. tonsurans* padrão ATCC 28942, foram alinhadas utilizando o programa MAFFT v. 7.429 (KATO; STANDLEY, 2013).

As sequências individuais de cada *loci* foram concatenadas e, em seguida, uma árvore filogenética com essas 24 cepas foi construída usando o software MEGAX (KUMAR et al., 2018). Para tanto, a diversidade genética das sequências foi analisada aplicando o método da ligação média entre grupos ou UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) usando um modelo de máxima verossimilhança composta (*maximum composite likelihood model*). Todas as *gaps* foram excluídas da análise e os ramos da árvore construída foram verificados usando 1000 réplicas *bootstrap*.

Tabela 2. Sequências gênicas de *Trichophyton tonsurans*, *T. equinum*, *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes* localizadas no Genbank.

| <i>T. tonsurans</i> | Número de acesso Genbank | | | Origem |
|---------------------|--------------------------|------------|------------|------------|
| | <i>ITS</i> | <i>LSU</i> | <i>TUB</i> | |
| ATCC MYA-4608 | KJ606101.1 | KJ606149.1 | KJ606197.1 | Canadá |
| CBS 496.48 | Z98005.1 | MF893237.1 | KT155352.1 | França |
| CBS 285.30 | KT155645.1 | MF893226.1 | KT155348.1 | Argentina |
| CBS 109034 | KT155682.1 | KT154996.1 | KT155374.1 | Canadá |
| CBS 112186 | KT155688.1 | KT155005.1 | KT155382.1 | Inglaterra |
| CBS 112189 | KT155690.1 | KT155007.1 | KT155384.1 | Inglaterra |
| CBS 112191 | KT155692.1 | KT155009.1 | KT155386.1 | Inglaterra |
| CBS 112193 | KT155693.1 | KT155011.1 | KT155388.1 | Inglaterra |

| | | | | |
|--------------------------|---------------------------------|------------|------------|---------------|
| CBS 112195 | KT155695.1 | KT155013.1 | KT155390.1 | Inglaterra |
| 92-2778 | MF158280.1 | MH392595.1 | MG267113.1 | Irã |
| 92-429 | MF158276.1 | MH392599.1 | MG267109.1 | Irã |
| 93-2733 | MF158274.1 | MH392601.1 | MG267119.1 | Irã |
| 93-306 | MF158284.1 | MH392592.1 | MG267116.1 | Irã |
| 93-91 | MF158262.1 | MH392613.1 | MG267097.1 | Irã |
| 94-80 | MF158286.1 | MH392590.1 | MG267117.1 | Irã |
| <hr/> | | | | |
| <i>T. equinum</i> | Número de acesso Genbank | | | Origem |
| | <i>ITS</i> | <i>LSU</i> | <i>TUB</i> | |
| ATCC 22443 | KX092379.1 | KX092400.1 | KX092421.1 | Nova Zelândia |
| ATCC MYA-4606 | KJ606100.1 | KJ606148.1 | KJ606196.1 | Finlândia |
| RCPF-936 | KT285213.1 | KT272001.1 | KT272014.1 | Russia |
| <hr/> | | | | |
| <i>T. interdigitale</i> | Número de acesso Genbank | | | Origem |
| | <i>ITS</i> | <i>LSU</i> | <i>TUB</i> | |
| CBS 475.93 | MF926357.1 | MF893235.1 | MF898383.1 | Canadá |
| <hr/> | | | | |
| <i>T. mentagrophytes</i> | Número de acesso Genbank | | | Origem |
| | <i>ITS</i> | <i>LSU</i> | <i>TUB</i> | |
| CBS 318.56 | MH857656.1 | MH869197.1 | KU378223.1 | Holanda |

5.6 Formação de biofilmes

Seis cepas de *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios (CEMM-01-3-089, CEMM-01-3-090, CEMM-01-3-091, CEMM-01-3-092, CWMM.01-3-093, CEMM-01-3-094) e a cepa *T. tonsurans* padrão ATCC 28942 foram cultivadas em ágar batata dextrose (PDA, Himedia, Índia) e incubadas a 28°C por 7 a 15 dias.

Os biofilmes foram formados em placas de poliestireno de 96 poços com fundo chato, utilizando o método descrito por Brilhante et al. (2017). As culturas foram cobertas com cerca de 2mL de solução salina 0,9% estéril, e friccionadas delicadamente com *swabs* estéreis. A mistura resultante de fragmentos de hifas e conídios foi transferida para tubos estéreis, e decantada por 5 minutos em temperatura de 28°C, para sedimentação das

hifas. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo estéril e ajustado para uma concentração de 10^6 UFC/mL. Alíquotas de 200 μ l foram adicionadas aos poços das placas de poliestireno e incubadas a 37 °C por 3 horas para adesão das células. Após a adesão, os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril e receberam 200 μ l de meio RPMI 1640 (Sigma - St Louis-USA). As placas foram então incubadas por 72 horas a 37 °C para formação do biofilme.

Os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS, fixados com 200 μ l de metanol a 100% (Grupo Química, São Paulo, Brasil) por 5 minutos, e logo depois, foram corados com 200 μ l da solução de cristal violeta 0,5% durante 20 min. Em seguida, os poços foram lavados por duas vezes com solução salina estéril 0.90% para remover o excesso do corante e descorados por 5 minutos pela adição de 200 μ l da solução de ácido acético a 33% (Grupo Química, São Paulo, Brasil). A solução de ácido acético foi cuidadosamente homogeneizada com uma pipeta até dissolução completa do cristal violeta. Finalmente, a solução de cada poço foi transferida para uma nova placa de 96 poços que foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. As leituras de poços que não receberam inóculo para formação de biofilme (controle negativo) foram utilizadas para determinação do ponto de corte (DOc) para determinação da formação de biofilme. Os DOc foram definidos como a média das leituras do controle negativo mais três desvios padrões. A leitura dos poços com biofilmes formados (DOT) foram utilizadas juntamente com as leituras de DOc para determinação da capacidade de formação de biofilme.

Todas as cepas foram classificadas como não produtoras de biofilme ($DOT \leq DOc$), produtoras fracas ($DOc < DOT \leq 2x DOc$), produtoras moderadas ($2x DOc < DOT \leq 4xDOc$) e forte produtoras ($4x DOc < DOT$) (CORDEIRO et al., 2015).

5.7 Sensibilidade dos biofilmes diante da Terbinafina e do Farnesol

Nessa etapa experimental utilizou-se terbinafina (TRB; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) e a molécula moduladora de *quorum sensing* Farnesol (FAR; Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), diluída em metanol.

Para o ensaio de sensibilidade dos biofilmes formados, as drogas foram diluídas em RPMI 1640 em concentrações variando de 18,75 – 1200 μ M (farnesol) e 2 – 128 μ g/mL (terbinafina). Os biofilmes formados em placas de 96 poços, conforme a metodologia descrita anteriormente, foram lavados duas vezes com PBS e submetidos aos tratamentos com drogas em concentrações de 18,75 – 1200 μ M (farnesol) e 2 – 128 μ g/mL (terbinafina). Após 96 horas de incubação, os biofilmes foram lavados duas vezes,

com PBS, para remover as células fracamente aderidas e em seguida foram submetidos a coloração com cristal violeta para avaliação da biomassa como descrito anteriormente e realizado o ensaio de redução de XTT (Sigma - St. Louis-USA) para avaliar a atividade metabólica.

No ensaio de redução do XTT, após o tratamento dos biofilmes com as drogas avaliadas, os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS e receberam uma solução de XTT (1 mg/mL) e menadiona (1 mM). Após a incubação no escuro por 3 horas a 37 °C, a solução foi transferida para uma nova placa de 96 poços que foi lida a em espectrofotômetro a 492 nm (BRILHANTE et al., 2017). A concentração inibitória mínima frente aos biofilmes foi determinada como a concentração mínima capaz de reduzir em 50% (CIMB50%) da atividade metabólica do biofilme quando comparado à atividade metabólica do controle de crescimento do biofilme da respectiva cepa sem a adição de antifúngicos.

5.8 Análise microscópica dos biofilmes

Por fim, selecionamos 2 cepas aleatórias de *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios (CEMM-03-1-089, CEMM-03-1-090) e a cepa *T. tonsurans* padrão ATCC 28942 para análise da morfologia dos biofilmes em microscopia eletrônica e confocal, objetivando verificar o comportamento estrutural dos biofilmes frente aos tratamentos com terbinafina e farnesol, e se a produção de clamidoconídios em cadeia, característica das cepas clínicas persistiam nesses biofilmes.

Para análise por microscopia eletrônica de varredura, os biofilmes foram lavados com tampão cacodilato (0,15 M, pH 7,2) duas vezes. Os biofilmes foram então cobertos com glutaraldeído [2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,15 M (pH 7,2) com 0,1% de azul alcian] e incubados a 25 ° C por 4 h. Posteriormente, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão de cacodilato e as lamínulas Thermanox foram desidratadas em uma concentração crescente de etanol (30, 50, 70, 80, 95 e 100%), por 10 minutos cada, repetindo a desidratação com a última concentração (etanol a 100%). Em seguida, os biofilmes foram secos à temperatura ambiente e cobertos com hexametildisilazano (HMDS) (Polysciences Europe, Alemanha) por 15 minutos. Posteriormente, o HMDS foi removido e os biofilmes foram secos durante a noite em um dessecador. As lâminas foram cobertas com 12 nm de ouro (Emitech Q150T) e observadas com um microscópio eletrônico de varredura Quanta 450-FEG no modo de alto vácuo a 20 kV (Brilhante et al.,2019).

Para a análise por microscopia confocal., os biofilmes foram lavados com tampão PBS e corados por 30 minutos com corante fluorescente Live/Dead (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As lâminas foram observadas em microscópio Confocal Nikon C2, utilizando lasers a 488 nm para detecção do fluorocromo Syto9, que identifica células vivas, e a 561nm para detecção do fluorocromo iodeto de propídeo, que identifica células mortas ou com dano de membrana (BRILHANTE et al., 2017).

5.9 Análise estatística

Para as análises realizadas foi utilizada a variável absorbância (DO). Os dados apresentaram simetria e variâncias semelhantes, sendo utilizado o teste t de Student para 1 ou 2 grupos de dados e a ANOVA para as análises realizadas em três ou mais grupos de dados, seguido do teste *post hoc* de *Tukey* para a comparação entre pares. Foi utilizado ainda o parâmetro redução dos valores de absorbância (em %) na comparação de diferentes concentrações das drogas pesquisadas nas cepas de *T tonsurans* em relação ao ATCC. Em todas as situações, o nível de significância máximo, adotado para conclusões afirmativas, foi de 5%.

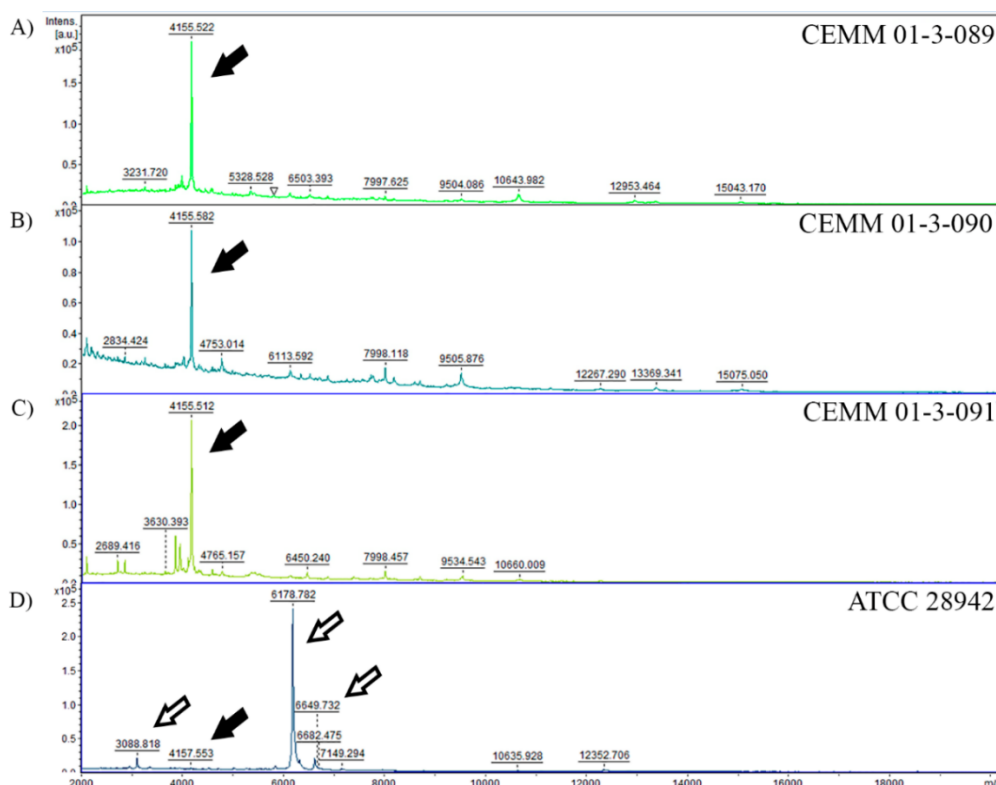
6 RESULTADOS

6.1 Perfil proteico

Todas as cepas de *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios apresentaram um elevado pico proteico com 4.155 Da altamente ionizado (figuras 9A, 9B e 9C), tanto no protocolo com avaliação direta da massa celular como no sobrenadante proteico, quando comparadas à cepa ATCC 28942, cujo pico de expressão foi bem inferior (figura 9D).

Já a cepa padrão *T. tonsurans* ATCC 28942 expressou picos de proteínas de 3.087 Da, 6.177 Da e 6649 Da (figura 9D) que não foram detectados em nenhuma das cepas de *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios, o que demonstra que existe um padrão de semelhança de expressão proteica entre as cepas de *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios utilizadas nesse experimento e algumas diferenças acentuadas das mesmas, em relação à cepa controle ATCC 28942.

Figura 9. Planos espectrais das cepas de *Trichophyton tonsurans* produtoras de clamidoconídios analisadas em MALDI-TOF.

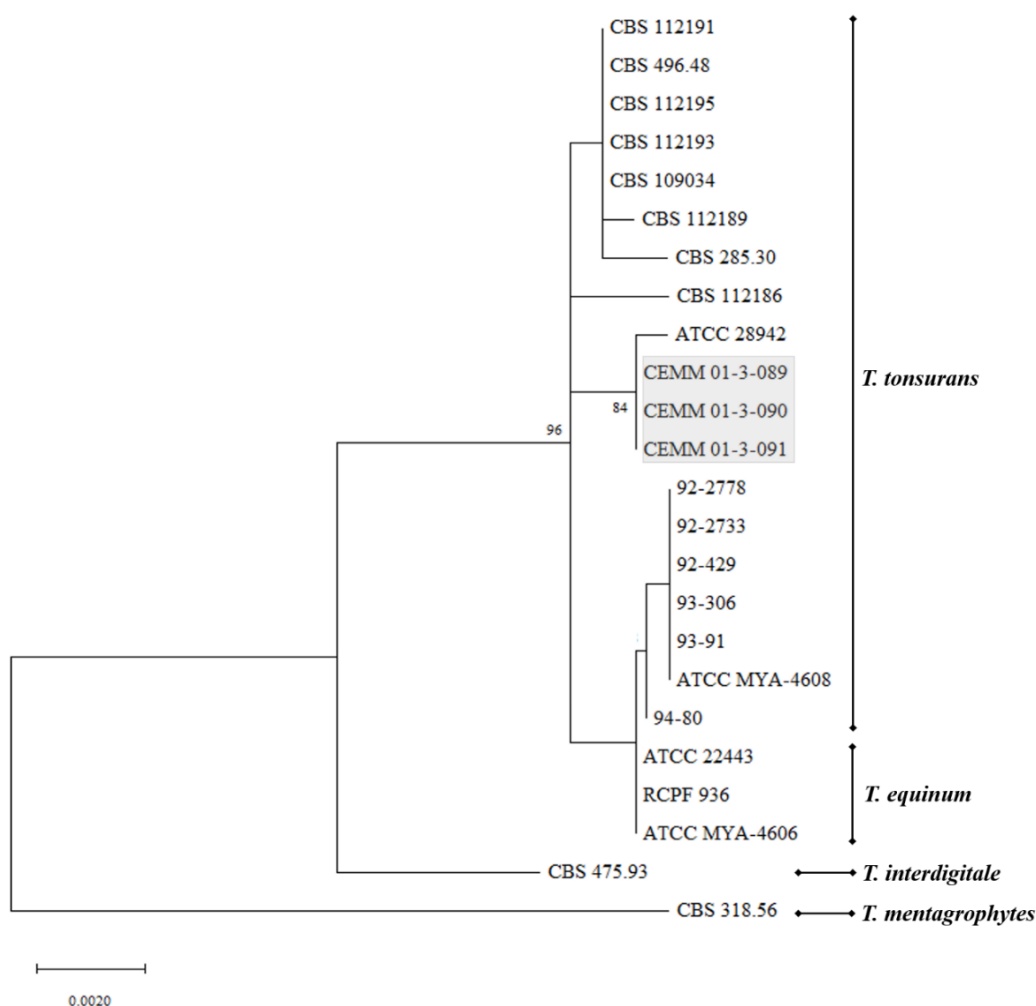


Legenda: 9A, 9B e 9C: Planos espectrais das cepas de *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios evidenciando uma elevada intensidade/ionização de uma proteína com 4.155 Da. 9D: Plano espectral da cepa ATCC 28942 com o pico referente a uma proteína de 4.155 Da, de intensidade muito inferior que as três amostras em análise e a elevada ionização de picos referentes a proteínas de 3.087, 6.177 e 6649 Da.

6.2 Perfil genético

A análise das sequências das regiões ITS, LSU e beta-tubulina mostraram que as cepas de *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios estão alocadas em um único *cluster*, e separadas da cepa controle ATCC 28942, das demais cepas de *T. tonsurans* cujas sequências foram retiradas do Genbank e oriundas de países como Canadá, França, Inglaterra, Argentina e Irã e das cepas de *T. equinum*, *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes* (figura 10).

Figura 10. Dendrograma de *Trichophyton tonsurans* produtor de clamidoconídios obtido pelo programa MEGA X.



Legenda: Dendrograma de *Trichophyton tonsurans* isolados do Ceará (CEMM 01-3-089, CEMM 01-3-090, CEMM 01-3-091). Sequências do espaço transcrito interno (ITS), subunidade grande (LSU) e beta-tubulina (TUB) foram concatenadas e, em seguida, alinhadas usando o software MEGAX. A história evolutiva foi inferida usando o método da Máxima Verossimilhança e o modelo General Time Reversible (GRT) [1]. A árvore com a maior probabilidade de log (-2629,65) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais os táxons associados se agruparam é mostrada ao lado dos galhos. A(s) árvore(s) inicial(is) para

a busca heurística foram obtidas aplicando o método Neighbour-Joining a uma matriz de distâncias aos pares que foi estimada usando a abordagem de Máxima Verossimilhança Composta (MCL). Uma distribuição Gama discreta foi usada para modelar as diferenças de taxa evolutiva entre os sítios (2 categorias (+ G, parâmetro = 0,1000)). O modelo de variação da taxa permitiu que alguns sítios fossem evolutivamente invariáveis ([+ I], 48,55% dos sítios). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos medidos em número de substituições por local. Esta análise envolveu 24 sequências de nucleotídeos. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do local foram eliminadas, ou seja, menos de 5% de lacunas de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidas em qualquer posição (opção de exclusão parcial). Havia um total de 1655 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA X. As sequências de cepas não utilizadas neste estudo foram obtidas no GenBank.

6.3 Formação e sensibilidade dos biofilmes diante da terbinafina e do Farnesol

Com base na quantificação de biomassa, foi verificado que todas as cepas do estudo são fortes formadoras de biofilme (Tabela 3).

Tabela 3. Formação de biofilmes, *in vitro* de isolados de *Trichophyton tonsurans* produtor de clamidoconídios.

| Espécie | Cepa | Absorbância (540nm) | Classificação da formação de biofilme |
|-------------------------------|--------------|---------------------|---------------------------------------|
| <i>Trichophyton tonsurans</i> | ATCC 28942 | 1,106 | Forte |
| | CEMM-01-3-89 | 0,787 | Forte |
| | CEMM-01-3-90 | 0,510 | Forte |
| | CEMM-01-3-91 | 0,613 | Forte |
| | CEMM-01-3-92 | 0,631 | Forte |
| | CEMM-01-3-93 | 0,740 | Forte |
| | CEMM-01-3-94 | 0,796 | Forte |

Legenda: ATCC: American Type Culture Collection.

As cepas de *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios produziram biofilmes com menor biomassa, porém com atividade metabólica comparável à cepa ATCC 28942. Tal fato, provavelmente, se deve por conta da redução da biomassa ter sido motivada pela redução da matriz com a manutenção das células, o que não acarreta necessariamente em redução da atividade metabólica.

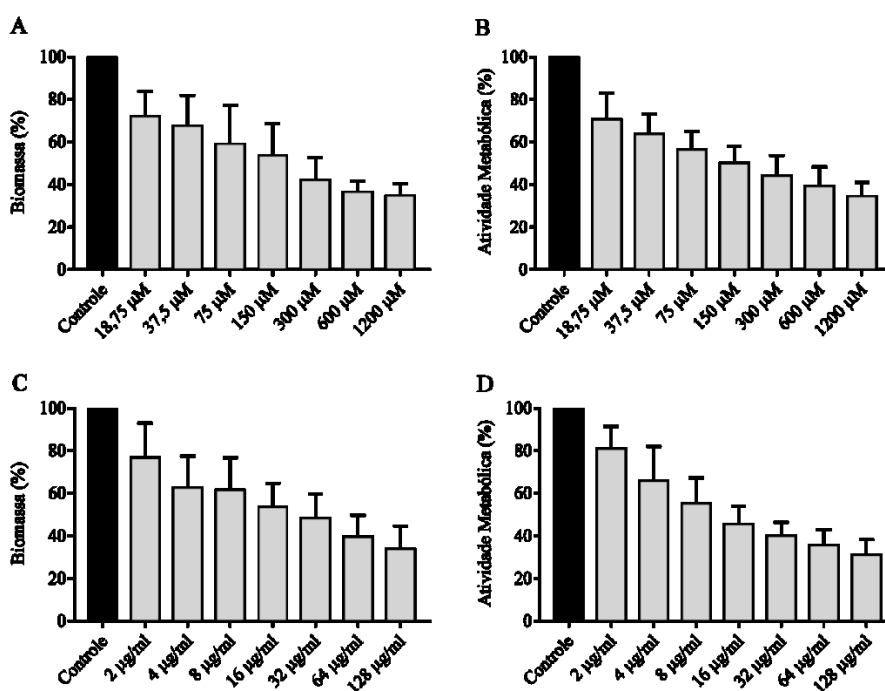
A ação da terbinafina e do farnesol sobre a biomassa e atividade metabólica dos biofilmes produzidos estão representadas na figura 11. Terbinafina reduziu em 66,22% a biomassa e em 69% a atividade metabólica, enquanto farnesol reduziu em até 65,15% da biomassa e 68,43% da atividade metabólica dos biofilmes.

A terbinafina reduziu significativamente ($p < 0,05$) a biomassa e da atividade metabólica dos biofilmes a partir das concentrações de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Já com o farnesol, a redução significativa da biomassa e da atividade metabólica dos biofilmes ocorreu a partir das concentrações de 300 μM e 18,75 μM , respectivamente.

Embora a terbinafina tenha sido eficaz na redução da atividade metabólica de todas as cepas, essa redução foi maior na cepa ATCC 28942 quando comparado aos biofilmes das cepas de *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios, o que pode significar que as cepas clínicas toleram maiores concentrações de terbinafina, já que a atividade metabólica é o parâmetro utilizado para indicar a morte das células do biofilme.

Já o farnesol foi mais eficaz na redução da biomassa do biofilme da cepa ATCC 289542 do que na redução da biomassa das cepas clínicas, que parecem tolerar maiores concentrações de farnesol.

Figura 11. Biomassa e atividade metabólica de biofilmes produtor de clamidoconídios expostos a farnesol e terbinafina.



Legenda: Biomassa (A e C) e atividade metabólica (B e D) de biofilmes de *Trichophyton tonsurans* produtor de clamidoconídios expostos a diferentes concentrações de farnesol (A e B) e terbinafina (C e D). Barras pretas correspondem aos biofilmes não tratados (controle). Barras cinza representam os biofilmes tratados com diferentes concentrações de farnesol ou terbinafina. Resultados expressos por média \pm desvio padrão.

A concentração inibitória mínima do biofilme entre as amostras pode ser observada na tabela 4. A CIMB_{50%} variou de 75 a 1200 μ M para farnesol e de 4 a 64 μ g/mL para terbinafina, no entanto não houve diferença estatística ($p > 0,05$) na eficácia de terbinafina e farnesol, quando comparado o intervalo de concentração de ambas as drogas.

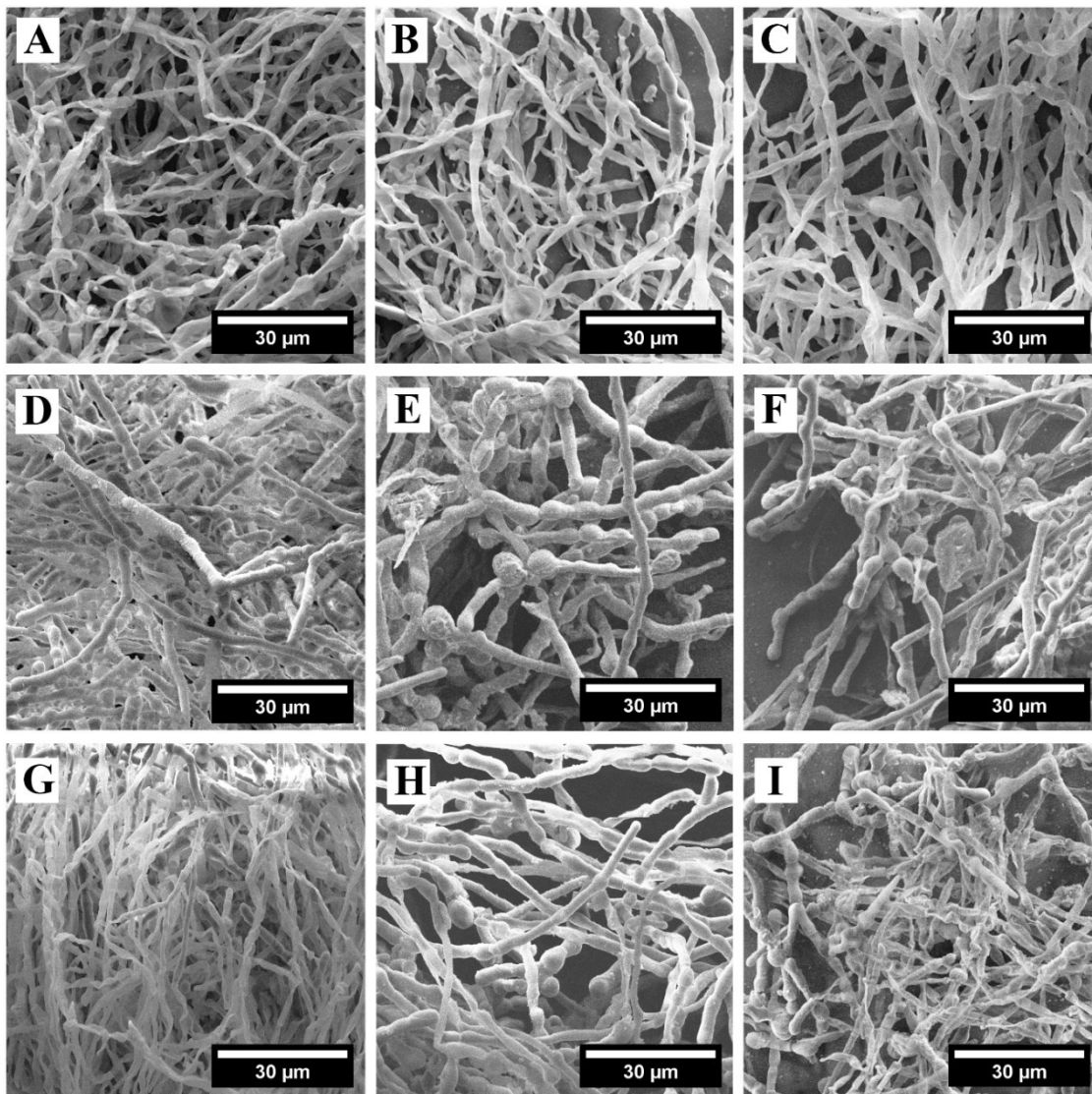
Tabela 4: Concentração inibitória mínima de farnesol e terbinafina frente a biofilmes de *Trichophyton tonsurans*.

| Cepas | Concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB _{50%}) | |
|--------------|---|---------------------------|
| | Farnesol (μ M) | Terbinafina (μ g/mL) |
| ATCC | 150 | 4 |
| CEMM-01-3-89 | 150 | 16 |
| CEMM-01-3-90 | 150 | 8 |
| CEMM-01-3-91 | 1200 | 64 |
| CEMM-01-3-92 | 75 | 32 |
| CEMM-01-3-93 | 150 | 16 |
| CEMM-01-3-94 | 300 | 16 |

Legenda: CIMB_{50%}: Concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% da atividade metabólica do biofilme. ATCC: American Type Culture Collection.

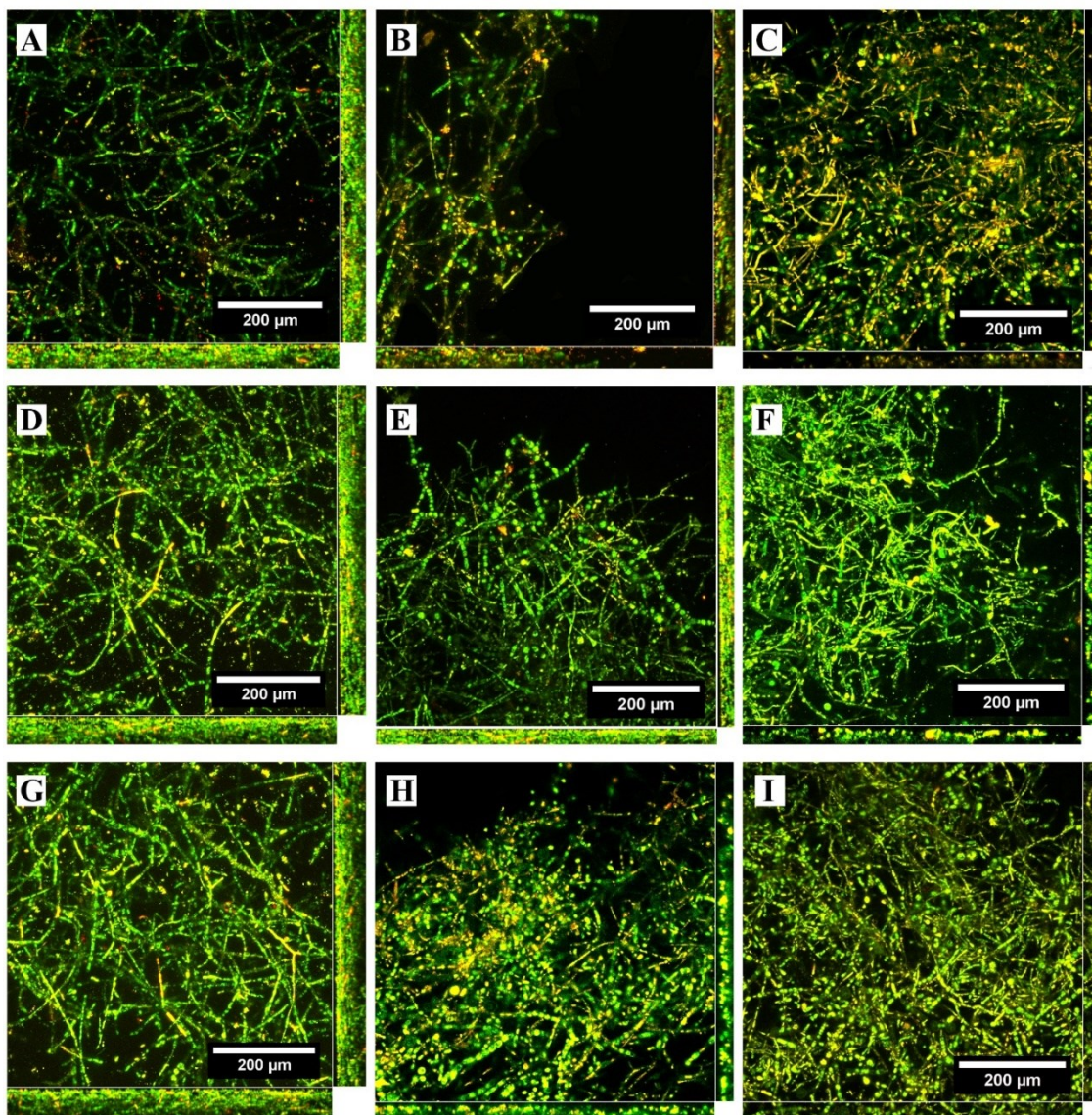
A redução da biomassa foi confirmada pela morfologia dos biofilmes em microscopia eletrônica e confocal (figuras 12 e 13). A concentração de 300 μ M de farnesol e 32 μ g/mL de terbinafina foram escolhidas por serem a concentração que reduz 50% da atividade metabólica (CIMB₅₀). Observou-se ainda que a produção de clamidoconídios em cadeia manteve nas cepas clínicas e permaneceu ausente na cepa ATCC.

Figura 12. Biofilmes de *Trichophyton tonsurans* tratados com terbinafina e farnesol em microscopia eletrônica de varredura.



Legenda: A, B e C - Biofilme de *T. tonsurans* e ATCC 28942 (controle, tratado com farnesol a 300 μ M e tratado com terbinafina a 32 μ g/mL, respectivamente). D, E, F- Biofilme da cepa CEMM-01-3-089 (controle, tratado com farnesol a 300 μ M e tratado com terbinafina a 32 μ g/mL, respectivamente). G, H e I - Biofilme da cepa CEMM-01-3-090 (controle, tratado com farnesol a 300 μ M e tratado com terbinafina a 32 μ g/mL, respectivamente).

Figura 13. Biofilmes de *Trichophyton tonsurans* tratados com terbinafina e farnesol visualizados em microscopia confocal



Legenda: A, B e C - Biofilme de *T. tonsurans* ATCC 28942 (controle, tratado com farnesol a 300 μ M e tratado com terbinafina a 32 μ g/mL, respectivamente). D, E, F- Biofilme da cepa CEMM-01-3-089 (controle, tratado com farnesol a 300 μ M e tratado com terbinafina a 32 μ g/mL, respectivamente). G, H e I - Biofilme da cepa CEMM-01-3-090 (controle, tratado com farnesol a 300 μ M e tratado com terbinafina a 32 μ g/mL, respectivamente). Magnificação: 400 \times (A – F). Escala: 200 μ m (A – F). Lasers: 488 nm para detecção de SYTO9 (cora em verde as células viáveis) e 561 nm para detecção de iodeto de propídio (cora em vermelho as células mortas ou com danos na membrana).

7 DISCUSSÃO

O achado de cadeias de clamidoconídios sem a presença de macro e microconídios, em cepas de *T. tonsurans* isoladas no nordeste do Brasil há quase duas décadas (BRILHANTE et al., 2019; BRILHANTE et al., 2021) é um fator complicador no diagnóstico laboratorial desses fungos, podendo resultar em identificações equivocadas, principalmente em laboratórios clínicos, onde os critérios morfológicos ainda são o principal pilar taxonômico na identificação dos dermatófitos.

Ademais, a identificação precisa desses fungos é fundamental para o estabelecimento de programas efetivos de controle e prevenção, bem como para determinar as terapias antifúngicas mais apropriadas e eficazes (CAFARCHIA et al., 2013).

Os clamidoconídios são estruturas produzidas assexuadamente, decorrentes da diferenciação de um segmento de hifa, devendo ser distinguidos de fragmentos de hifas degeneradas, arthroconídios e até mesmo das esférulas imaturas de *Coccidioides immitis* (KIMURA et al., 2012). Sua produção é um critério útil para a identificação de algumas espécies fúngicas, como *Candida albicans*, onde surgem durante crescimento em meios de cultura pobres em nutrientes, que muitas vezes são complementados com Tween-80 e são incubados em temperatura ambiente, preferencialmente sob condições limitadas de oxigênio (STAIB; MORCHHAUSER, 2007).

Janson e Nickerson (1970) dedicaram-se ao estudo da composição dos clamidoconídios e descobriram que eles possuem uma camada externa fina composta de glucano, junto com uma pequena quantidade de quitina e uma camada interna, espessa e densa, de origem proteica. A estrutura central é composta principalmente por ácido ribonucléico e lipídios.

Por possuírem paredes espessas e citoplasma condensado, apresentam maior resistência aos fatores externos, sendo considerados, por alguns autores, estruturas de resistência fúngica, facilitando a sobrevivência em condições ambientais adversas (SIDRIM; ROCHA, 2004; STAIB; MORCHHAUSER, 2007) ou até mesmo como uma célula de armazenamento, em especial, de material lipídico (BAKERSPIGEL; BURKE, 1974), mas sua função biológica exata ainda permanece enigmática.

A descoberta de que a formação de clamidoconídios é controlada por certos sinais ambientais em *C. albicans* e *C. dubliniensis* indica novas abordagens para estudar a regulação desse programa morfogenético. Alguns estudos já identificaram genes e vias de sinalização que são necessários para a produção de clamidoconídios e devem levar a uma compreensão detalhada desse fascinante processo de desenvolvimento (STAIB; MORRCHHAUSER, 2007).

A estrutura dos clamidoconídios varia de globosa a ovoide e eles podem se localizar de forma intercalar ou terminal ao longo das hifas, sendo encontrados mais comumente somente em leveduras como *Candida albicans* e em algumas espécies de Mucorales (KIANIPOUR; ARDESTANI; DEHGHAN, 2018; KIMURA et al., 2012). Nos dermatófitos, seu achado é apenas ocasional e em espécies como *Trichophyton concentricum* e *Trichophyton verrucosum* (DE HOOG et al., 2015b; SIDRIM; ROCHA, 2004) ou ainda em culturas antigas de *Trichophyton terrestre* (HAYETTE; SACHELI, 2017), não possuindo, no entanto, valor taxonômico nas chaves de classificação e/ou identificação desses fungos.

Nas cepas analisadas no presente estudo, a produção de numerosas cadeias de clamidoconídios é um achado constante em cepas jovens, já a partir do 5º dia de crescimento e em meios de cultura de semeadura primária, desprovidos de substâncias estimuladoras da produção de clamidoconídios, tais como o twenn 80 ou ágar taurocolato de sódio.

A ocorrência de estruturas similares a clamidoconídios em cepas de *T. tonsurans* foi relatada por Mochizukit et al. em 2013, quando analisando 25 cepas de *T. tonsurans* observaram a produção de estruturas ovoides, medindo entre 7-10 µm, após semeadura em ágar mycosel e incubação por 5 a 8 dias. Os autores investigaram as estruturas por meio de microscopia eletrônica e postularam que não eram clamidoconídios verdadeiros e sim regiões vacuolares produzidas pela inflação de hifas de crescimento ativo. No entanto, diferindo das nossas cepas, Mochizukit et al. não descreveram alterações conjuntas na macromorfologia das colônias e nem lançaram luz sobre a motivação da produção consistente dessas estruturas particulares pelo *T. tonsurans*.

A identificação das cepas de *T. tonsurans* produtoras de clamidoconídio utilizadas no presente estudo foi confirmada tanto por MALDI-TOF MS quanto por métodos de biologia molecular. Graser et al. (2008) pontuam que, mesmo com a crescente disponibilidade de modernas técnicas genéticas, não é incomum que cepas de dermatófitos que expressam características fenotípicas similares entre si, revelem-se

distintas à luz de estudos genéticos, bem como espécies com fenótipos diferenciados apresentem material genético indistinguível, quando analisadas com marcadores moleculares. Em adição, Abdel-Rahman et al. (2008), ponderam que não está claro se a variabilidade fenotípica encontrada entre isolados de *T. tonsurans* possa ser acompanhada de variações no genoma.

Brash e Glaser (2019) defendem que características fenotípicas estão sujeitas a uma certa plasticidade, sendo fortemente influenciadas por condições ambientais. Assim, cepas com o mesmo genótipo podem expressar características morfológicas e fisiológicas diferentes, enquanto cepas com características fenotípicas semelhantes podem apresentar diferenças genotípicas (BRASH, 2004).

A apresentação fenotípica atípica observada nas cepas de *T. tonsurans* isoladas no Ceará, com a produção constante de cadeias de clamidoconídios associada ao desenvolvimento de colônias glabras com escasso micélio aéreo e pigmento amarelo-marrom intenso, sugere que as mesmas sejam dotadas de plasticidade fenotípica, possivelmente, para permitir a adaptação a estressores ambientais, como mudanças climáticas e presença de compostos tóxicos, entre outros (BRILHANTE et al., 2019). Esta hipótese é apoiada pela observação de que a produção de cadeias de clamidoconídios permanece constante, mesmo nos biofilmes produzidos por essas cepas clínicas após o tratamento com terbinafina e farnesol, uma característica não observada na cepa controle *T. tonsurans* ATCC 28942.

O perfil de espectro de massa das cepas clínicas mostrou-se diferenciado da cepa controle (ATCC 28942), pois apresentaram um pico de elevada intensidade da proteína com 4.155 Da e ausência das proteínas de 3.087 Da, 6.177 Da e 6649 Da, evidenciando diferenças entre a proteômica de *T. tonsurans*. Logo as cepas apresentam alterações fenotípicas marcantes sem alterações genéticas, mas com expressão proteica diferenciada.

O uso da espectrometria de massa de tempo de voo de dessorção/ionização assistida por matriz (MALDI-TOF MS) para identificação laboratorial de dermatófitos é relativamente recente (NENOFF et al., 2013; CASSAGNE et al., 2016; L'OLLIVER; RANQUE, 2017), muito embora a técnica da espectrometria de massa já seja utilizada desde o final do século XIX e aplicada para identificação de microrganismos, especialmente bactérias, a partir da década de 1970 (ALUYI; DRUCKER, 1979; FISHER-HOCH et al., 1979). Segundo L'Ollivier e Ranque, 2017, a expansão dessa tecnologia foi facilitada pelo desenvolvimento de técnicas de ionização e permitiram a análise de um painel abrangente de proteínas.

Entre 2008 e 2015, alguns estudos abordaram a questão da identificação de dermatófitos utilizando MALDI-TOF (ERHARD et al., 2008; L'OLIVIER et al., 2013; NENOFF et al., 2013, CALDERARO et al., 2014; KARABIÇAK et al., 2015), com desempenho da identificação variando entre 13,5 e 100%, dependendo do estudo. A variabilidade no desempenho da identificação deveu-se, em parte, as inconsistências em algumas etapas críticas do processo laboratorial tais como o meio de cultura utilizado para o crescimento do fungo, tempo de incubação da cultura e procedimento de extração de proteínas, bem como a limitação de espectros de referência nas bibliotecas comerciais, sendo primordial atualizar os bancos de dados com novas sequências de DNA de dermatófitos (L'OLLIVER; RANQUE, 2017).

Embora o uso da espectrometria de massa para identificar espécies de dermatófitos esteja crescendo em popularidade, ainda não há estudos que descrevam a composição proteica de cepas de *T. tonsurans* com características morfológicas atípicas, tais como as cepas produtoras de clamidoconídio apresentadas no presente estudo, sendo nossa pesquisa pioneira em publicações envolvendo o estudo proteico de *T. tonsurans* com morfologia fenotípica atípica (BRILHANTE et al., 2021). Logo, outras abordagens para identificar proteínas detectadas pelo MALDI-TOF MS em dermatófitos são necessárias, bem como estudos complementares para identificar a proteína de 4.155 Da a partir do peso molecular e buscar uma correlação positiva com a produção de clamidoconídios

A falta de associação direta entre genótipos fúngicos e fenótipos correspondentes (Morfologia da colônia/morfologia microscópica/sexualidade e composição genética) tem provocado debates entre os micologistas, especialmente em relação à definição de “espécies de dermatófitos”. Algumas cepas que foram consideradas espécies distintas, baseadas em profundas diferenças na morfologia e no padrão de infecção, são agora consideradas sinônimos de acordo com a filogenia baseada em DNA e análises genéticas das populações (L'OLLIVER; RANQUE, 2017).

Mais recentemente, o conceito de espécie filogenética vem sendo incorporado à base de classificação dos dermatófitos (BRASH; GLASER, 2019; MARTINEZ et al., 2012; ACHTERMAN; WHITE, 2012) e a construção de cladogramas a partir de informações genéticas promete trazer novos elementos para a já complicada taxonomia dermatofítica.

Em 2017, De Hoog et al. propuseram, a partir da análise multi-loci de sequências parciais de ITS e LSU, TUB e 60S L10 uma nova classificação para esses fungos,

dividindo-os em clados monofiléticos e polifiléticos, compreendendo os gêneros *Arthroderma*, *Epidermophyton*, *Lophophyton*, *Microsporum*, *Nannizzia*, *Paraphyton*, *Trichophyton* e *Ctenomyces*, recolocando os dermatófitos em um novo patamar de interesse de pesquisa.

A análise das sequências das regiões ITS, LSU e beta-tubulina mostraram que as cepas de *T. tonsurans* produtoras de clamidoconídios estão alocadas em um único *cluster*, e separadas da cepa controle ATCC 28942 e de outras cepas de *T. tonsurans* oriundas de países como Canadá, França, Inglaterra, Argentina e Irã, sugerindo uma possível associação positiva entre essas cepas e suas características morfológicas diferenciadas.

Nossos achados corroboram com o argumento da provável divergência alopatrica de *T. tonsurans* preconizado por Abdel-Rahman et al. (2010), que analisaram o grau de parentesco genético entre isolados de *T. tonsurans* geograficamente separados de 14 países e sugeriram um grau de agrupamento por região geográfica, alocando-os em 7 *clusters*. Assim, cepas oriundas dos EUA foram fortemente distribuídas em 3 *clusters* próximos, enquanto as cepas mexicanas ocuparam um outro *cluster* exclusivo, fato semelhante ao que ocorreu com cepas do continente asiático, que compartilharam um *cluster* entre si. Em contraste, os isolados europeus foram espalhados entre seis dos sete *clusters* clonais. Nenhum *cluster* único continha isolados de cada um dos continentes representados neste estudo, embora um único continente (Europa) estivesse representado entre seis dos sete *clusters*. A maioria das cepas estava restrita a um único país ou continente. Embora esses autores tenham avaliado 198 cepas de *T. tonsurans* de várias partes do mundo, nenhuma de suas amostras veio do Brasil, deixando uma lacuna a preencher.

A despeito dos casos de tolerância a antifúngicos, falha clínica e recidiva serem mais frequentemente observados em outros grupos de fungos, alguns estudos relataram tolerância ou resistência a dermatófitos (BURKHART; BURKHART; GUPTA, 2002; GHANNOUN, 2016; MAJID et al., 2016). Vários fatores, incluindo a formação de biofilme, podem estar associados à suscetibilidade reduzida a medicamentos antifúngicos (RAMAGE et al., 2012; MAJID et al., 2016, INDIRA, 2014).

Embora a maioria dos estudos de biofilmes fúngicos tenham investigado leveduras, alguns têm demonstrado o envolvimento de dermatófitos na formação de biofilmes *in vitro* e *in vivo*, permitindo seu crescimento mesmo quando expostos a altas concentrações de antifúngicos (BRILHANTE et al., 2017; LIN et al., 2018). Segundo

alguns autores, a formação de biofilme pelos dermatófitos explica em parte a recalitrância desses microrganismos aos antifúngicos, principalmente nos casos de onicomicose (BURKHART; BURKHART; GUPTA, 2002; GUPTA; DAIGLE; CARVIEL, 2016; PERES et al., 2010).

O conceito de biofilmes em infecções por dermatófitos foi introduzido por Burkhart et al. (2002) que sugeriu que a formação de biofilme por esses microrganismos poderia explicar a presença de elementos de fungos vivos, tais como hifas e arthroconídios, fortemente aderidos à placa da unha, no caso de dermatofitoma.

Estudos recentes demonstraram que algumas espécies de dermatófitos apresentaram capacidade de formação de biofilme *in vitro*, em lamínulas de poliestireno (COSTA-ORLANDI et al., 2014; DOS SANTOS; DIAS-SOUZA et al., 2017). Costa-Orlandi et al. (2014) relataram que *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, dermatófitos antropofílicos disseminados em todo o mundo, formaram biofilmes *in vitro*, o que poderia estar associado à dificuldade de diagnóstico e tratamento, à sua alta prevalência, e consequentemente problemas econômicos acarretados (HAYETTE; SACHELI, 2017). Portanto, é importante conhecer a capacidade dos dermatófitos em produzir biofilme como um fator de virulência.

Todas as cepas do estudo mostraram-se forte formadoras de biofilme, coadunam-se com os achados descritos por Brilhante et al. (2017) que ao realizarem análises quantitativas e estruturais da capacidade de formação de biofilme *in vitro* e *ex vivo* de 5 espécies de dermatófitos (*Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum*) encontraram que todas essas espécies são capazes de formar biofilmes *in vitro* e *ex vivo*, com densidade e arquitetura variáveis, sendo que as cepas de *T. tonsurans* testadas produziram biofilmes robustos, com matriz e biomassa abundantes.

Assim, a capacidade dos dermatófitos de aderir ao tecido do hospedeiro e formar biofilme, além de ser um fator importante na sua patogênese, também pode ser um importante mecanismo de resistência às drogas antifúngicas convencionalmente utilizadas no tratamento das dermatofitoses e que por consequência pode estar relacionado disseminação da doença (PERES et al., 2010; JASIM et al., 2016).

Os estudos sobre a suscetibilidade dos biofilmes de dermatófitos são escassos. Aqui, o efeito inibitório da terbinafina e farnesol em biofilmes de *T. tonsurans* foi

avaliado e mostraram ação semelhante sobre a biomassa e a atividade metabólica de seus biofilmes. Os valores da concentração inibitória mínima do biofilme (CIMB_{50%}) variaram entre 75 e 1200 µM para farnesol e 4 a 64 µg/mL para terbinafina, não havendo diferença estatística na eficácia dos dois, quando comparado o intervalo de concentração de ambas as drogas. Os valores do CIMB_{50%} para terbinafina contra biofilmes de *T. tonsurans* foram menores que o relatado por Lin et al. (2014) para biofilmes de *T. rubrum* e *M. canis* (256 µg / mL).

Um aspecto que tem sido amplamente investigado em relação ao processo de formação de biofilme é o papel das moléculas de *quorum sensing*. Esta forma de comunicação molecular em comunidades microbianas tem sido relativamente bem estudada entre espécies bacterianas, mas não em fungos. Farnesol, uma molécula de detecção de *quorum* secretada por *C. albicans*, foi a primeira molécula sensora de quorum descrita em um organismo eucariótico (WONGSUK; PUMEEESAT; LUPLERTLOP, 2016). Estudos anteriores relataram a atividade antimicrobiana do farnesol contra bactérias, como *Burkholderia pseudomallei* (CASTELO-BRANCO et al., 2016) e *Staphylococcus* spp. (CERCA et al., 2012), bem como contra alguns fungos, como *C. albicans* (XIA et al., 2017), *Aspergillus flavus* (WANG et al., 2014) e *Coccidioides posadasii* (BRILHANTE et al., 2013).

Os relatos dos efeitos do farnesol nos biofilmes têm aumentado, incluindo achados de sua influência na formação do biofilme de várias espécies de fungos (BRILHANTE et al., 2015; WONGSUK; PUMEEESAT; LUPLERTLOP, 2016). Aqui nós descrevemos a atividade antifúngica do farnesol contra biofilmes de cepas de *T. tonsurans* produtoras de clamidoconídio. A droga causou reduções significativas da biomassa e da atividade metabólica, resultados semelhantes aos relatados para a terbinafina ao comparar os intervalos de concentração das duas substâncias.

O aumento significativo da resistência antifúngica tornou crucial a identificação de novos compostos antimicrobianos, especificamente para a identificação de estratégias terapêuticas direcionadas a infecções relacionadas ao biofilme. O desenvolvimento de inibidores de *quorum sensing* que inibem os sistemas de comunicação célula-célula envolvidos na regulação da produção do fator de virulência, colonização do hospedeiro e formação de biofilme é uma opção atraente para o controle de tais infecções persistentes que são difíceis de tratar (JABRA-RIZK et al., 2006)

A atividade do farnesol contra as células fúngicas é complexa, e pode envolver vários mecanismos, incluindo o comprometimento da membrana celular e a inibição da síntese de ergosterol (SEBAA et al., 2019; BRILHANTE et al., 2013; JABRA-RIZK et al., 2006), inibição da síntese de proteínas em *C. albicans* (EGBE et al., 2017), indução da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em *Saccharomyces cerevisiae* e indução de fragmentação mitocondrial, condensação nuclear e outros sinais de apoptose em *Aspergillus nidulans* (SEMIGHINI et al., 2006).

No entanto, embora os efeitos do farnesol tenham sido foco de muitos estudos, seu modo de ação exato ainda não é conhecido, dificultando inferir quais mecanismos podem estar envolvidos na inibição dos biofilmes de *T. tonsurans* observados neste estudo.

Logo, o conhecimento dos espectros de massa e da análise filogenética de cepas de *T. tonsurans* produtoras de clamidoconídio sugere que as características morfológicas atípicas apresentadas por essas cepas são decorrentes de plasticidade fenotípica, possivelmente por adaptação a estressores ambientais, representando, portanto, divergência alopátrica da espécie. Além disso, a atividade antibiofilme do farnesol contra *T. tonsurans* poderia ser explorada para o desenvolvimento de formulações promissoras de drogas anti-biofilme contra dermatófitos.

Por fim, pondera-se que mesmo que o conceito de espécie filogenética seja na atualidade a base das classificações taxonômicas dos dermatófitos e o enfoque genético tenha trazido muitas informações adicionais ao conhecimento historicamente acumulado sobre esses fungos, nem todas as espécies de dermatófitos são claramente definidas e o uso exclusivo de características genéticas para criar cladogramas filogenéticos findará por negligenciar outras informações taxonomicamente relevantes como características morfológicas, fisiológicas, ambientais, epidemiológicas e fisiopatológicas (BRASCH; GLASER, 2019). Assim, o campo da taxonomia dermatofítica parece ainda ter um vasto caminho pela frente a ser desvendado.

8 CONCLUSÕES

- *Trichophyton tonsurans* produtor de clamidoconídios apresenta perfil proteico diferenciado da cepa padrão *T. tonsurans* ATCC 28942, expressando proteína com 4.155 Da e ausência de picos de proteínas de 3.087 Da, 6.177 Da e 6649 Da;
- As cepas de *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios estão filogeneticamente alocadas num mesmo *cluster*, permitindo inferir que apresentam padrões genotípicos semelhantes entre si;
- A apresentação fenotípica atípica observada nas cepas de *T. tonsurans* isoladas no Ceará, com a produção constante de cadeias de clamidoconídios associada ao desenvolvimento de colônias glabras com escasso micélio aéreo e pigmento amarelo-marrom intenso, sugere que sejam dotadas de plasticidade fenotípica, podendo representar uma divergência alopátrica dessa espécie;
- *T. tonsurans* produtor de clamidoconídios é forte formador de biofilmes;
- Terbinafina e o farnesol apresentaram ação semelhante sobre a biomassa e a atividade metabólica de seus biofilmes, indicando atividade antifúngica do farnesol frente a biofilmes de *T. tonsurans*.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, S.M.; TALIB, N.; SOLIDAR, A.; NOPPERS, A.J.; WYCKOFF, G.J. Examining *Trichophyton tonsurans* genotype and biochemical phenotype as determinants of disease severity in *tinea capitis*. **Medical Mycology.**, v.46, p.217-223, 2008.

ABDEL-RAHMAN, S.M., SUGITA, T.; GONZÁLEZ, G.M.; ELLIS, D.; ARABATZIS, M.; VELLA-ZAHRA, L.; VIGUIÉ-VALLANET, C.; HIRUMA, M.; LEEDER, J.S.; PREUETT, B. Divergence among an international population of *Trichophyton tonsurans* isolates. **Mycopathologia.**, v. 169, p. 1–13, 2010.

ACHTERMAN, R.R.; WHITE T.C. A foot in the door for dermatophyte reserch. **Plos Pathogens.**, v.8, n.3, 2012.

AHMADI, B.; MIRHENDI, H.; SHIDFAR, M.R.; NOURIPOUR-SISAKHT H.; JALALIZAND, N.; GERAMISHOAR, M.; SHOKOOHI, G.R. A comparative study on morfological versus molecular identification of dermatophytes isolates. **J. Mycol.Med.**, v.25, n.1, p. 29-35, 2015.

AJELLO, L. Natural history of the dermatophytes and related fungi. **Mycopathol Mycol Appl.**, v. 53, p. 93-110, 1974.

ALGBURI, A.; COMITO, N.; KASHTANOV. D.; DICKS, L.M.; CHIKINDAS. M.L. Control of biofilm formation: antibiotics and beyond. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 83. 2017.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v.215, p.403-410, 1990.

ALUYI, H.A.; DRUCKER, D.B. Fingerprintings of carbohydrates of *Streptococcus mutans* by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr.**, v.78, p.209-218, 1979.

ANSARI, S.; HEDAYATI, M.T.; ZOMORODIAN, K.; PAKSHIR, K.; BADALI, H.; RAFIEI, A.; RAVANDEH, M., SEYEDMOUSAVI, S. Molecular Characterization and *in vitro* Antifungal Susceptibility of 316 Clinical Isolates of Dermatophytes in Iran. **Mycopathologia.**, v. 181, n.1-2, p.89-95, 2016.

BADILLET, G. **Dermatophyties et dermatophytes- Atlas clinique et biologique**. Paris: Ed. Varia, 3^a ed., 1986.

BAERT, F.; STUBBE, D.; D'HOOGHE, E.; PACKEU, A.; HENDRICKX, M. Updating the taxonomy of dermatophytes of the BCCN/IHEM Collection according to the new standard: A phylogenetic approach. **Mycopathologia**., v.185, n.1, p. 161-168, 2020.

BAKERSPIGEL, A.; BURKE, S. A possible function of the chlamydospores of *Candida albicans*. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**., v.54, p. 147–152, 1974.

BASTERT, J.; KORTING, H.C. Diagnostic methods for species-specific differentiation of various dermatophytes. Possibilities and limitations. **Dtsch. Med.Wochenschr.**, v. 123, n.16, p. 499-503, 1998.

BHAT, Y.J.; ZURAK, S.; KANTH, F.; YASSEN, A.; HASSAN, I.; HAKAK, R. Clinicoepidemiological and mycological study of *tinea capitis* in the pediatric population of Kashmir Valley: A study from a tertiary care center. **Indian Dermatology on line Jornal**., v.8, n.2, p.100-103, 2017.

BOUCHARA, J.P.; MIGNUM, B.; CHATURVEDI, V. Dermatophytes and dermatophytoses: a thematic overview of state of the art and the directions for future research and development. **Mycopatologia**., v. 12, p.1-4, 2017.

BRASCH J. Standard and recently developed methods for the differentiation of dermatophytes. **Hautarzt**., v.55, n.2, p.136-142, 2004.

BRASCH, J.; GLASER, R. Dinamic diversity of dermatophytes. **Hautarzt**., v.70, n.8, p.575-580, 2019.

BRILHANTE, R.S.N.; PAIXÃO, G.C.; SALVINO, L.K.; DIÓGENES, MJN, BANDEIRA, S.P.; ROCHA, M.F.G.; SANTOS, J.B.F.; SIDRIM, J.J.C. Epidemiologia e ecologia das dermatofitoses na cidade de Fortaleza: o *Trichophyton tonsurans* como importante patógeno emergente de *Tinea capitis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 33, n.5, p. 417-425, 2000.

BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G., MONTEIRO, A.J.; MEIRELES, T.E.; SIDRIM, J.J.C. *Tinea capitis* in a dermatology center in the city of Fortaleza, Brazil: the role of *Trichophyton tonsurans*. **Int. J. Dermatol.**, v. 43, n.8, p. 575-579, 2004.

BRILHANTE, R.S.N.; DE LIMA, R.A.C.; CAETANO, E.P.; LEITE, J.J.G.; RIBEIRO, J.F.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G..Effect of farnesol on growth, ergosterol biosynthesis and cell permeability in *Coccidioides posadasii*. **Antimicrob. Agentes Chemother.**, v.57, n.5, p. 2167-2170, 2013.

BRILHANTE, R.S.N.; DE LIMA R.A.C.; MARQUES, F.J.F.; SILVA, N.F.; CAETANO, E.P.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; BANDEIRA, T.J.P.G.; MOREIRA, J.L.B.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; DE CAMARGO, Z.P.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. **J.Med.Microbiol.**, v. 64, n. 4, p. 394-399, 2015.

BRILHANTE, R.S.N.; CORREIA, E.E.M.; GUEDES, G.M.M.; PEREIRA, V.S.; OLIVEIRA, J.S.; BANDEIRA, S.P.; ALENCAR, L.P.; ANDRADE, A.R.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; CORDEIRO, R.A.; PINHEIRO, A.Q.; CHAVES, L.J.Q.; PEREIRA NETO, W.A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Quantitative and structural analyses of the *in vitro* and *ex vivo* biofilm forming ability of dermatophytes. **J. Med. Microbiol.**, v. 66, n.7, p.1045-1052, 2017.

BRILHANTE, R.S.N.; PAIXÃO, G.C.; DE OLIVEIRA, J.S.; PEREIRA, V.S.; ROCHA, M.F.G.; DE LIMA-NETO, R.G.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; CORDEIRO, R.A.; SIDRIM, J.J.C. Chlamydoconidium-producing *Trichophyton tonsurans*: Atypical morphological features of strains causing *tinea capitis* in Ceará, Brazil. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v.12, n.8, p. 380-384, 2019.

BRILHANTE, R.S.N.; PAIXÃO, G.C.; PEREIRA, V.S.; DE OLIVEIRA, J.S.; MACIEL, J.M.; PEREIRA NETO, W.A.; DE LIMA-NETO, R.G.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; CORDEIRO, R.A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Atypical Chlamydoconidium-producing *Trichophyton tonsurans* strains from Ceará State, Northeast Brazil: investigation of taxonomy by phylogenetic analysis and biofilm susceptibility. **Microbiology.**, v.167, n.2, 2021.

BURKHARTA, C.N.; BURKHART, C.G.; GUPTA, A.K. Dermatophytoma: recalcitrance to

treatment because of existence of fungal biofilm. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.47, p. 629–631, 2002.

CAFARCHIA, C.; IATTA, R.; LATROFA, M.S.; GRASER, Y.; OTRANTO, D. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. **Infect. Genet. Evol.**, v. 20, p. 336-351, 2013.

CALDERARO, A.; MOTTA, F.; MONTECHINNI, S.; GORRINI, C.; PICCOLO, G.; PIERGIANNI, M.; BUTTRINI, M.; MEDICI, M.C.; ARCANGELETTI, M.C.; CHEZII, C.; DE CONTO, F. Identification of dermatophytes species after implementation of the in-house MALDI-TOF MS database. **Int. J. Mol. Sci.**, v.15, n.9, p.16012-24, 2014.

CASSAGNE, C; NORMAND, A.C; OLIVIER, C; RANQUE. S; PIARROUX, R. Performance of MALDI-TOF platforms for fungal identification. **Mycoses.**, v.59, p. 678-690, 2016.

CASTELO-BRANCO, D.; RIELLO, G.B.; VASCONCELOS, D.C.; GUEDES, G.M.M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T.; MONTEIRO, A.J.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C. Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. **J. Appl. Microbiol.**, v.120, p. 600–606, 2016.

CERCA, N.; GOMES, F.; PEREIRA, S.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R. Confocal laser scanning microscopy analysis of *S. epidermidis* biofilms exposed to farnesol, vancomycin and rifampicin. **BMC Res. Notes**, v. 5, p. 244, 2012.

CHEN, X.; JIANG, X.; YANG, M.; BENNETT, C.; GONZÁLEZ, U.; LIN, X. Systemic antifungal therapy for *tinea capitis* in children: an abridged cochrane review. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.76, n.2, p.368-74, 2017.

CORDEIRO, R.A.; SERPA, R.; ALEXANDRE, C.F.U.; MARQUES, F.J.F.; MELO, C.V.S.; FRANCO, J.S.; EVANGELISTA, A.J.J.; CAMARGO, Z.P.; BRILHANTE, R.S.N.; ROCHA, M.F.G.; MOREIRA, J.L.B.; BANDEIRA J.P.G. SIDRIM, J.J.C. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. **J. Med. Microbiol.**, v.64, p.1277-86, 2015.

CORDEIRO, R., PEREIRA, L., DE SOUSA, J., SERPA, R., ANDRADE, A., PORTELA, F., EVANGELISTA, A., SALES, J., AGUIAR, A., MENDES, P., BRILHANTE, R.S.N, SIDRIM, J.J.C, CASTELO-BRANCO, D., ROCHA, M.F.G. Farnesol Inhibits Planktonic Cells and Antifungal-Tolerant Biofilms of *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin*. **Med. Mycol.** 57, 2019.

COSTA-ORLANDI, C.B.; SARDI, J.C.; SANTOS, C.T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDESGIANNINI, M.J.S. *In vitro* characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* Biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719-27, 2014.

COULIBALY, O.; L'OLLIVIER, C.; PIARROUX, R.; RANQUE, A. Epidemiology of human dermatophytoses in Africa. **Medical Mycology.**, v.56, n.2, p.145-161, 2018.

DABAS, Y.; XESS, I.; SINGH, G.; PANDEY, M.; MEENA, S. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility Patterns of Clinical Dermatophytes Following CLSI and EUCAST Guidelines. **J Fungi (Basel)**. v.3, n.2, p.17, 2017.

DE HOOG, G.S.; CHATURVEDI, V.; DENNING, D,W.,DYER, P.S.; FRISVAD, J.C.; GEISER, D. et al., Name changes in medically important fungi and their implications for clinical practice. **Journal of Clinical Microbiology.**, v.53, n.4, p. 1056-1062, 2015a.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M.J. **Atlas of Clinical Fungi**, 3^a web-edition, 2015b.

DE HOOG, G.S.; DUKIK, K.; MONOD, M.; PACKEU, A.,; STUBBE, D.; HENDRICKX, M.; KUPSCH, C.; STIELOW, J.B.; FREEKE, J.; GOKER, M.; REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; MIRHENDI, H.; GRASER, Y. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. **Mycopathologia**. v.182, n.1-2, p. 5-31, 2017.

DE RESPINIS, S.; MONNIN, V.; GIRARD, V.; et al., Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using the Vitek MS system for rapid and accurate identification of dermatophytes on solid cultures. **J. Clin. Microbiol.**, v.52, p.4286–92, 2014.

DONLON, R.M.; COSTERTON, W. Biofilmes: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Reviews**, v.15, n.2, p.167-193, 2002.

DOS SANTOS, R.M.; DIAS-SOUZA, M.V. Effectiveness of five antidandruff cosmetic formulations against planktonic cells and biofilms of dermatophytes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, p.331-337, 2017.

DROUEH, E. Recherches sur la nutrition des dermatophytes des acides aminés sur la croissance et la morphogénèse. **Ann. Inst. Pasteur.**, v.82, p. 1-8, 1952.

DURAN-VALLE, M.T.; REGODON-DOMINGUEZ, M.; VELASCO-RODRÍGUEZ, M.J.; ARAGÓN, A.; GÓMEZ-GARCÉZ, J.L. Outbreak of *Trichophyton tonsurans* ringworm in a health área of the Community of Madri (Spain). **Rev. Iberoam. Micol.** v. 33, n.2, p.126-8, 2016.

EGBE, N.E., DORNELLES, T.O., PAGET, C.M., CASTELLI, L.M., ASHE, M.P. Farnesol inhibits translation to limit growth and filamentation in *C. albicans* and *S. cerevisiae*. **Microb. Cell.**, v. 4, p. 294–304, 2017.

ELEWSKI, B.E.; CÁCERES, H.W.; DELEON, L.; EL SHIMY, S.; HUNTER, J.A.; KOROTKIY, N. Terbinafine hydrochloride oral granules versus oral griseofulvin suspension in children with *tinea capitis*: results of two randomized, investigator-blinded, multicenter, international, controlled trials. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.59, n.1, p.41-54, 2008.

EMMONS, C.W. Dermatophytes. Natural grouping based on the form of the spores and accessory organs. **Arch. Dermatol. Syphilol.**, v.30, p.362-377, 1934.

ERHARD, M.; HIPLER, U.C.; BURMESTER, A.; BRAKHAGE, A.A.; WOSTEMEYER, J. Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and *tinea pedis* by MALDI-TOF mass spectrometry. **Exp Dermatol.**, v.17, p.356–61, 2008.

FISHER-HOCH, S.; HUDSON, M.J.; THOMPSON, M.H. Identification of a clinical isolate as *Legionella pneumophila* by gas chromatography and mass spectrometry of cellular fatty acids. **Lancet**, v.2, p.323-325, 1979.

FLEECE, D; GAUGHAN, J.P; ARONOFF, S.C. Griseofulvin and terbinafine in the treatment of *tinea capitis*: a meta-analysis of randomized, clinical trials. **Pediatrics**, v.114, p.1312-1315, 2004.

FLEMMING, H.C; WINGENDER, J; SZEWZYK, U; STEINBERG, P; RICE, S.A; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 14, p. 563, 2016.

GEORG, L.K. Studies on *Trichophyton tonsurans*. I. The taxonomy of *T. tonsurans*. **Mycologia.**, v.8, p.65-82, 1956a.

GEORG, L.K. Studies on *Trichophyton tonsurans*. II. Morphology and laboratory identification. **Mycologia.**, v. 48, p. 354-370, 1956b.

GEORG, L.K. Routine nutritional test for the identification of dermatophytes. **J. Bacteriol.**, v.74, p.113-121, 1975.

GHANNOUM, M. Azole resistance in dermatophytes: prevalence and mechanism of action. **J. Am. Pediatr. Med. Assoc.**, v. 106, p.79–86, 2016.

GIANNI, C. Update on antifungal therapy with terbinafine. **G. Ital. di dermatologia e Venereol.**, v.145, p. 415–424, 2010.

GNAT, S.; LAGOWSKI, D.; NOWAKIEWICK, A. Major challenges and perspectives in the diagnostics and treatment of dermatophyte infections. **J Appl Microbiol.**, v.129, n.2, p.212-232. 2020.

GONZALEZ, U; SEATON, T; BERGUS, G et al., Systemic antifungal therapy for *tinea capitis* in children. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v.17, CD004685, 2007.

GOSTINČAR, C. Towards Genomic Criteria for Delineating Fungal Species. **J. Fungi**, v.6, n.4, p.246, 2020.

GRAY, R.M.; CHAMPAGNE, C.; WAGHORN, D.; ONG, E.; GRABCZYNSKA, S.A.; MORRIS, J. Management of a *Trichophyton tonsurans* outbreak in a day-care center. **Pediatric Dermatology**, v.32, n.1, p. 91-96, 2015.

GRASER Y., EL FARI M., PRESTER W., STERRY N., TIETZ H.J. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporon*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. **Br. J. Dermatol.**, v. 138, p. 576-582, 1998.

GRASER, Y.; EL FARI, M.; VILGALYS, R.; KUIJPERS, A.F.; DE HOOG, G.S.; PRESBER, W.; TIETZ H. Phylogeny and taxonomy of the Family Arthrodermatacea (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. **Med. Mycol.**, v.37, p. 105-114, 1999.

GRASER Y.; MONOD, M.; BOUCHARA, J.P.; DUKIK, K.; NENOFF, P.; KARGL, A. et al., New insights in dermatophytes research. **Med. Mycol.**, v.56, n. 1, p.2-9, 2018.

GUPTA, A.K; FAAD, F.R.C.P; DRUMMOND-MAIN, C. Meta-analysis of randomized, controlled trials comparing particular doses of griseofulvin and terbinafine for treatment of *tinea capitis*. **Pediatric Dermatology**, v.30, n.1, p.1-6, 2013.

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

GUPTA, A.K.; FOLEY, K.A.; VERSTEEG, S.G. New Antifungal Agents and New Formulations Against Dermatophytes. **Mycopathologia**, v.182, n.1.2, p.127-141, 2017.

GUPTA, A.K., MAYS, R.R., VERSTEEG, S.G., PIRACCINI, B.M., SHEAR, N.H., PIGUET, V., TOSTI, A., FRIEDLANDER, S.F.. *Tinea capitis* in children: a systematic review of management. **J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.**, v.32, p. 2264–2274, 2018.

HALL, T.A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41, 95-98, 1999.

HAYASHI N., TAKASHIO, M. Mating type *Trichophyton tonsurans* **MyKosen.**, v.27, n.8, p. 377- 379. 1984.

HAY, R.J.; CLAYTON, Y.M.; DE SILVA, N.; MIDGLEY, G.; ROSSOR, E. *Tinea capitis* in south-east London- a new pattern of infection with public health implications. **Br. J. Dermatol.**, v. 135, p.955-958, 1996.

HAYETTE, M.P.; SACHELLI, R. Un unusual specie of dermatophytes: rarely identified or news? **Mycopathologia**, v.182, n1-2, p. 203-213, 2017.

HEDAYATI, M.T.; ANSARI, S.; AHMADI, B.; ARMAKI, M.T.; SHOKOHI, T.; ABASTABAR, M.; ER, H.; OZHAK, B.; OGUNÇ, D., ILKIT, M., SEYEDMOUSAVI, S. Identification of clinical dermatophyte isolates obtained from Iran by matrix-assited laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Curr.Med. Mycol.**, v.5, n.2. 0.22-26, 2019.

HEIDRICH, D.; GARCIA, M.R.; STOPIGLIA, A.C.D.O.; MAGAGNIN, C.M.; DABOIT, T.C.; VETORATTO, G.; SCHATZ, J.; AMARO, T.G.; SCROFERNEKER, M.L. Dermatophytosis: a 16-years retrospective study in a metropolitan área in Southern Brazil. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v.9, n.8, p.865-871, 2015.

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, F.; ERICKSSON, O.E et al., Higher-level phylogenetic classification of the fungi. **Mycological Research.**, v.111, p.509-547, 2007.

HIROSE, N.; TAMURA, M.; SUGANAMI, M.; OGAWA, Y.S.; HIRUMA, M. The results of *Trichophyton tonsurans* screening examinations and infection management in University Judo Federation of Tokyo Athletes over a 4-years period. **Med. Mycol. J.**, v.53, p.267-271, 2012.

HIRUMA, J.; OGAWA, Y.; HIRUMA, M. *Trichophyton tonsurans* infection in Japan: epidemiology, clinical features, diagnosis and infection control. **J. Dermatol.**, v.42, p. 245-249, 2015.

INDIRA, G. In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of 5 Antifungal Agents against Dermatophytic Species by CLSI (M38-A) Micro Dilution Method. **Clin. Microbiol.**, v 3,p. 1–5, 2014.

IRINYI, L; SERENA, C; GARCIA-HERMOSO, D, et al., International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database—the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. **Med. Mycol.**, v. 53, p.13–37, 2015.

JABRA-RIZK, M.A., SHIRTLIFF, M., JAMES, C., MEILLER, T. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. **FEMS Yeast Res.**, v.6, n.7, p.1063–1073, 2006.

JAMAL., M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S.; JALIL, F.; IMRAN, M.; NAWAZ. M.A.; HUSSAIN, T.; ALI, M.; RAFIQ, M.; KAMIL. M.A. Bacterial biofilm and associated infections. **J. Chin. Med. Assoc.**, v. 81, p.7–11, 2018.

JANSONS, V.K.; NICKERSON, W.J. Chemical composition of chlamydo spores of *Candida albicans*. **J Bacteriol.**, v.104, n.2, p.922-32, 1970.

JASIM, S.T.; FLAYYIH, M.T.; HASSAN, A.A.K. Biofilm formation and susceptibility to itraconazole in *Candida albicans*. **W. J. Pharm. Pharmaceutical Sciences**, v.5, n.8, p.1704-1716, 2016.

KANDEMIR, H.; DUKIK, K.; HAGEN, F.; ILKIT, M.; GRASER, Y.; DE HOOG, G.S. Polyphasic discrimination of *Trichophyton tonsurans* and *T. equinum* from humans and horses. **Mycopathologia**, v.185, n.1, p.113-122, 2020.

KARABIÇAK, N; KARATUNA, O.; ILKIT, M; MAKYAR I. Evaluation of the Bruker matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) system for the identification of clinically important dermatophyte species. **Mycopathologia**, v.180, p.165–71, 2015.

KATOH, K; STANDLEY, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Mol. Biol. Evol.**, v.30, n.4, p. 772–780, 2013.

KIANIPOUR, S., ARDESTANI, M., DEGHAN, P. Identification of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* Species Isolated from Bronchoalveolar Lavage Samples Using Genotypic

and Phenotypic Methods. **Adv. Biomed. Res.**, v.7, p. 66, 2018.

KIM, J.Á.; TAKIZAWA. K., FUKUSHIMA K.; NISHIMURA K.; MIYAJI M. Identification and genetic homogeneity of *Trichophyton tonsurans* isolated from several regions by random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Mycopathologia**, v. 145, n. 1, p. 1-6, 1999.

KIMURA, M., NISHIMURA, K., ENOKI, E., CHIKUGO, T., MAENISHI, O. Chlamydozoospores of *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* in Tissue of Pulmonary Mucormycosis. **Mycopathologia**, v.174, p. 441–450, 2012.

KINBARA, T., SAITO, T., KAEDA H. Black dot ringworm due to *Trichophyton tonsurans*. **J. Clin. Dermatol.**, v. 35, p.963-967, 1981.

KNOGGE, W. Fungal pathogenicity. **Curr. Opin. Plant. Biol.**, v.1, n.4, p.324-8, 1998.

KOC, A.N.; ATALAY, M.A.; INCI, M.; SARIGUZEL, F.M.; SAV, H. Identification and molecular epidemiology of dermatophyte isolates by repetitive-sequence-PCR- based DNA fingerprinting using the DiversiLab system in Turkey. **Mycoses**. n.60, v.5, p.348-354, 2017.

KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Mol. Biol. Evol.**, v.35, n.6, p.1547–1549, 2018.

KUPSCH, C.; OHST, T.; PANKEWITZ, F, NENOFF, P.; UHRLAB, S.; WINTER, I.; GRASER Y. The agony of choice in dermatophyte diagnostics-performance of different molecular tests and culture in the detection of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 22, n.8, p.735.e11-735.e17, 2016.

LARONE, D.H. **Medically important fungi- a guide to identification**. ASM press, 3^a edição, 1995.

LIN, H.; LIU, X.; ZHENG, Y.; SHEN, Z.; JIANG, T.; TANG, C. Construction of biofilm models of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* and observation of their sensibility to terbinafine. **Shandong Med. J.**, 2018:7, 2018.

LIU D., COLOE, S., PEDERSON, J., BAIRD, R. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate *Trichophyton* dermatophytes. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 136, n. 2, p. 147-50, 1999.

L'OLLIVIER, C.; CASSAGNE. C.; NORMAND; A.C., BOUCHARA, J.P.; CONTENT-AUDONNEAU, N. et al., A MALDITOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. **Med Mycol.**, v. 51, p. 713–20, 2013.

L'OLLIVIER, C.; RANQUE S. MALDI-TOF-Based Dermatophyte identification. **Mycopathologia**, v.182, n.1-2, p. 183-192, 2017.

MAJID, I., SHEIKH, G., KANTH, F., HAKAK, R. Relapse after oral terbinafine therapy in dermatophytosis: A clinical and mycological study. **Indian J. Dermatol.**, v. 61, p. 529, 2016.

MARTINEZ, D.A.; OLIVER, B.G.; GRASER. Y.; GOLDBERG, J.M., LI. W.; MARTINEZ-ROSSI. N.M. et al., Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection. **MBio.**, v. 3: p. 259-12, 2012.

MARKLEIN, G; JOSTEN, M; KLANKE, U, MULLER, E; HORRE, R; MAIER, T; WENZEL, T; KOSTRZEWA, M; BIERBAUM, G; HOERAUF, A; SAHL, HG. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 2912–7, 2009.

MAYSER, P.; NENOFF, P.; REINEL, D.; ABECK, D.; BRASCH, J.; DAESCHLEIN, G., et al., S1 guidelines: *Tinea capitis*. **J Dtsch Dermatol Ges.**, v.18, n.2, p.161-179, 2020.

MIKAEILI, A.; KAVOUSSI, H.; HASHEMIAN, A.H.; SHABANDOOST GHESHTEMI, M.; KAVOUSSI, R. Clinico-mycological profile of *tinea capitis* and comparative response to griseofulvin versus terbinafine. **Curr Med Mycol.**, v.5, n.1, p.15-20. 2019.

MLYNÁRIKOVÁ, K.; ŠEDO, O.; RŮŽIČKA, F.; ZDRÁHAL., Z.; HOLÁ, V.; MAHELOVÁ, M. Evaluation of capacity to detect ability to form biofilm in *Candida parapsilosis sensu stricto* strains by MALDI-TOF MS. **Folia Microbiol. (Praha)**, v. 61, n. 6, p. 465–471, 2016.

MOCHIZUKIT, T.; ANZAWA, K.; SAKATA, Y.; FUJIHIRO M. Simple identification of *Trichophyton tonsurans* by chlamydospore-like structures produced in culture media. **J. Dermatol.**, v. 40, n.12, p.1027-1032, 2013.

MOCHIZUKIT, T.; TAKEDA, K.; ANZAWA, K. Molecular markers useful for intraspecies subtyping and strain differentiation of dermatophytes. **Mycopathologia**, v.182, n.1-2, p 57-65, 2017.

MONOD, M. Récente révision des espèces de dermatophytes et de leur nomenclature. **Rev. Med Suisse**, n.13, v.556, p.703-708, 2017.

MURRAY, P.R. What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont hospital symposium on molecular pathology. **J. Mol. Diagn.**, v. 14, p.419–23, 2012.

NARAYANA, P.; SRIHARI, P. Biofilm resistant surfaces and coatings on implants: A review. **Mater. Today Proc.**, v. 18, p. 4847–4853, 2019.

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

NENOFF, P.; KRUGER, C.; GINTER-HANSELMAYER, G.; TIETZ, H.J. Mycology-an update. Part 1: Dermatomycoses: causatives agentes, epidemiology and pathogenesis. **J.Dtsch. Dermatol. Ges.**, v.12, n.3, p.188-209, 2014.

PADHYE, A.A., WETZMAN, I., DOMENECH, E. An unusual variant of *Trichophyton tonsurans* var. *sulfureum*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, n. 2, p. 147-150. 1994.

PAIXÃO, G.C.; ROCHA, M.F.G.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.; BRILHANTE, R.S.N.; SIDRIM, J.J.C. **Dermatophytes**. In: CORDEIRO, R.A (org). Pocket Guide to Mycological Diagnosis. Florida: CRC PRESS. p. 81-97, 2020.

PERES, N.T. DE A., MARANHÃO, F.C.A., ROSSI, A., MARTINEZ-ROSSI, N.M..

Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **An. Bras. Dermatol.**, v. 85, p. 657–667, 2010.

PIHET, M.; LE GOVIC, Y. Reappraisal of conventional diagnosis for dermatophytes. **Mycopathologia**, v.182, p.169-180. 2017

POLKE, M.; LEONHARD, I.; KURZAI, O.; JACOBSEN, I.D. Farnesol signalling in *Candida albicans* more just communication. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.44, n.2, p.230-243. 2018.

RADEMAKER, M; HAVILL, S. Griseofulvin and terbinafine in the treatment of *tinea capitis* in children. **N.Z.Med. J.**, v.111, p.55-57, 1998.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **Int. J. Microbiol.**, v. 2012, p. 528-521, 2012.

RANQUE S.; NORMAND, A.C.; CASSAGNE. C., et al., MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. **Mycoses**, v.57, p. 135–40, 2014.

REBELL, G.; TAPLIN G. **Dermatophytes, their identification and recognition**. 2nd ed. University of Miami Press, Miami, USA, 1970.

REZAI-MATEHKOLEI, A.; MIRHENDI, H.; MAKIMURA, K.; DE HOOG, G.S.; SATOH, K.; NAJAFZADEH, M.J.; SHIDFAR, M.R. Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes. **Med Mycol.**, v.52, p.674-688, 2014.

RIVALIER, E. Sur la taxonomie de dermatophytes. **Ann. Inst. Pasteur.** p. 877-87, 1966.

SAXENA, P.; JOSHI, Y.; RAWAT, K.; BISHT, R. Biofilms: architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms. **Indian J. Microbiol.**, v. 59, n. 1, p. 3–12, 2019.

SAKATA, Y.; USHIGAMI, T.; ANZAWA, K.; MOCHIZUKI, T. Molecular epidemiology of *Trichophyton tonsurans*, the causative dermatophyte of the tinea gladiatorum epidemic in Japan between 2011 and 2015. **Jpn J. Infect. Dis.**, v. 71, p.140-144, 2018.

SEBAA, S., BOUCHERIT-OTMANI, Z., COURTOIS, P. Effects of tyrosol and farnesol on *Candida albicans* biofilm. **Mol. Med. Rep.**, v.19, p.3201–3209, 2019.

SEMIGHINI, C.P.; HORNBY, J.M.; DUMITRU, R.; NICKERSON, K.W.; HARRIS, S.D. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. **Mol Microbiol.**, v.59, n.3, p.753-64, 2006.

SENG, P., ROLAIN, J.M., FOURNIER, P.E., SCOLA, L.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. **Future Microbiol.**, v. 5, p. 1733–54, 2010.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2004.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G, LEITE. J.J.; MARANHÃO, J.C.; LIMA, R.A, CASTELO-BRANCO, D.S.; BANDEIRA, T.J.; CORDEIRO, R.A.; BRILHANTE, R.S.N *Trichophyton tonsurans* strains from Brazil: phenotypic heterogeneity, genetic homology and detection of virulence genes. **Can. J. Microbiol.**, v.59, n.11, p. 754-60, 2013.

STAIB, P.; MORSCHHÄUSER, J. Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme. **Mycoses**, v. 50, n.1, p.1-12, 2007.

STEWART, P. S.; WHITE, B.; BOEGLI, L.; HAMERLY, T.; WILLIAMSON, K. S.; FRANKLIN, M. J.; BOTHNER, B.; JAMES, G. A.; FISHER, S.; VITAL-LOPEZ, F. G.; WALLQVIST, A. Conceptual Model of Biofilm Antibiotic Tolerance That Integrates Phenomena of Diffusion, Metabolism, Gene Expression, and Physiology. **J. Bacteriol.**, v. 201, n. 22, p. e00307-19, 2019

STOCKDALE, P.M. Sexual stimulation between *Arthroderma simii* and other dermatophytes. In: Vanbreuseghen, R., De Vroy C. **Sexuality and pathogenicity of fungi**. Ed. Masson, Paris, p. 57-68, 1981.

SUH, S.O; GROSSO, K.M; CARRION, M.E. Multilocus phylogeny of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex and the application of matrix-assisted laser desorption/ionization-

time-of-flight (MALDO-TOF) mass spectrometry for the rapid identification of dermatophytes. **Mycologia**, v.110, n.1, p.118-130, 2018.

SUMMERBELL, R.C; MOORE, M.K; STARINK-WILLEMSA, M; VAN IPEREN, A. ITS barcodes for *Trichopyton tonsurans* and *T. equinum*. **Med. Mycol.**, v.45, p.193-200, 2007.

TAKASHIO, M. Taxonomy of dermatophytes based on their sexual states. **Mycologic.**, v.71, p. 968-976, 1979.

TEY, H.T.; TAN, A.S.; CHAN, Y.C. Meta-analysis of randomized, controlled trials comparing griseofulvin and terbinafine in the treatment of *tinea capitis*. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.64, p.663-670 2011.

TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

VAN VEEN, S.Q.; CLAAS, E.C.J.; KUIJPER, E.J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p 900–7, 2010.

VASANTHI, R.; KARTHIKEYAN, D.; JEYA M. Study of biofilm production and antimicrobial resistance pattern of the bacterial isolates from invasive devices. **International Journal of Research in Health Sciences**, v. 2, n. 1, p. 415-424, 2014.

VEASEY, J.V.; MAYOR, S.A.S.; MURAMATU, L.H.; MIGUEL B.A.F.; ZAITZ. C.; SERRANO, J.Á. Epidemiological profile of *tinea capitis* in São Paulo city. **An. Bras. Dermatol.**, v.92, n.2, p 283-4, 2017.

VERALDI, S; GENOVESE, G; PEANO, A. A tinea corporis caused by *Trichophyton equinum* in a rider and review of the literature. **Infection**, v.46, n.1, p.135-137, 2018.

VERRIER, J.; MONOD, M. Diagnosis of dermatophytosis using molecular biology. **Mycopathologia**, v. 182, p.193-202, 2017.

VINGATARAMIN, Y.; AKHOUND, M.; BRUEL, C.; IZRI, A.; BRUN, S. Epidemiological and molecular characterization of a *Trichophyton tonsurans* epidemic in schools of a city in the northern suburbs of Paris, France. **Clin. Microbiol Infect.**, v. 24, n.4, p. 529-530, 2019.

WANG, X.; WANG, Y.; ZHOU, Y.; WEI, X. Farnesol induces apoptosis-like cell death in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, v.106, p.881-888, 2014.

WEITZMAN, I; SALKIN, I.F; ROSENTHAL., R.A. Evaluation of *Trichophyton* agars for identification of *Trichophyton soudanense*. **J Clin Microbiol.**, v.18, p.18:203–5, 1983.

WEITZMAN, I.; MCGINNIS, M.R.; PADHE, A.A.; AJELLO, L. The genus *Arthoderma* and its synonym *Nannizia*. **Mycotaxon**, v.25, p.505-518, 1986.

WEITZMAN I.; SUMMERBELL, R.C. The dermatophytes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.8, n.2, p. 240-59, 1995.

WONGSUK, T., PUMEESAT, P., LUPLERTLOP, N. Fungal quorum sensing molecules: role in fungal morphogenesis and pathogenicity. **J. Basic. Microbiol.**, v.56, p.440–447, 2016.

XIA, J., QIAN, F., XU, W., ZHANG, Z., WEI, X. In vitro inhibitory effects of farnesol and interactions between farnesol and antifungals against biofilms of *Candida albicans* resistant strains. **Biofouling**, v.33, p.283–293, 2017.

ZHAN, P.; LIU, W. The changing face of the dermatophytic infections worldwide. **Mycopathologia.**, v.182, n.1-2, p. 77-86, 2017.

APÊNDICE A – Glossário de termos micológicos e taxonômicos

| |
|--|
| <p>Alcladium- tipo de disposição de conídios ao longo das hifas. Os conídios são formados diretamente na hifa sempre em sentido contrário. Estrutura comum a algumas espécies de dermatófitos.</p> |
| <p>Alopécia- região do corpo ou couro cabeludo onde há perda de pêlos.</p> |
| <p>Algodonoso - termo aplicado às colônias que possuem um aspecto que lembra a textura de algodão.</p> |
| <p>Anamorfo- corresponde ao estado de reprodução assexuado.</p> |
| <p>Antropofílico- termo aplicado aos fungos dermatofíticos que infectam primariamente o homem.</p> |
| <p>Apiculado- termo aplicado às colônias que possuem uma saliência na parte central lembrando um pequeno cume.</p> |
| <p>Artroconídios- conídios derivados da desagregação ou desarticulação da parede celular dos fungos filamentosos. Pode ser encontrado diretamente no material clínico (em casos de dermatofitose) ou como achado microscópico de culturas de fungos como <i>Coccidioides immitis</i>. Alguns grupos de micologistas utilizam o termo artrosporos.</p> |
| <p>Cerebriforme- termo aplicado às colônias com relevo semelhante às circunvoluções típicas do cérebro.</p> |
| <p>Clamidoconídio- estruturas produzidas assexuadamente, decorrentes da diferenciação de um segmento de hifa. Variam de globosos a ovoides e podem se localizar de forma intercalar ou terminal ao longo das hifas. Possuem paredes espessas e citoplasma condensado, apresentando maior resistência aos fatores externos.</p> |
| <p>Cleistotécio: Ascocarpo constituído de estrutura globosa, compacta e completamente fechada revestidas por hifas peridiaias que encerra em seu interior ascos e ascósporos que são liberados pela ruptura ou desintegração da parede.</p> |
| <p>Colônia- unidade estrutural formada em um meio de cultura e evidenciada macroscopicamente. Possui morfologia e colorações diversas.</p> |
| <p>Conidiogênese- processo ou seqüência de eventos que resulta na formação de um novo conídio. É basicamente de dois tipos: blástica e tálica.</p> |

| |
|--|
| <p>Conídio – Propágulo de reprodução assexuada que se forma de diversas formas a partir de uma célula conidiogênica. Não possui nenhum envoltório externo.</p> |
| <p>Crateriforme- diz-se das colônias que apresentam na superfície reentrâncias, no meio de cultura ou na própria colônia, assumindo o aspecto de uma cratera.</p> |
| <p>Dendograma- diagrama de árvore que exhibe grupos formados por níveis de similaridade.</p> |
| <p>Dermatófito- grupo especializado de fungos que, geralmente, em vida parasitária, vivem às custas da queratina disponível em pele, pêlos, unhas. Esse grupo engloba três gêneros: <i>Epidermophyton</i>, <i>Microsporum</i> e <i>Trichophyton</i>.</p> |
| <p>Divergência alopátrica- diz-se quando duas ou mais populações de uma espécie são separadas por uma barreira geográfica.</p> |
| <p>Eletroferograma- registro gráfico resultado da separação de moléculas de DNA por eletroforese capilar.</p> |
| <p>Ectotrix- tipo de parasitismo piloso onde o fungo não consegue penetrar o interior do pêlo, ficando circunscrito à sua bainha externa.</p> |
| <p>Endotrix- tipo de parasitismo piloso onde o fungo destrói a bainha externa do pêlo, se alojando e proliferando no interior dos pêlos.</p> |
| <p>Equinulado- diz-se da superfície rugosa encontrada em alguns conídios fúngicos, tais como nos macroconídios de <i>Microsporum sp.</i></p> |
| <p>Estado imperfeito- diz-se do estado de reprodução assexuada.</p> |
| <p>Estado perfeito- diz-se do estado de reprodução sexuada.</p> |
| <p>Estruturas de frutificação- achado microscópico compatível com estruturas de reprodução assexuada (conídios e esporos). Juntamente com as estruturas de ornamentação são responsáveis pela diferenciação da maioria das espécies fúngicas.</p> |
| <p>Estruturas de ornamentação- estruturas que assumem diversas formas e variedades e que podem estar presentes em diversas espécies fúngicas. Não se conhece nenhuma função biológica, entretanto são fundamentais como auxiliares na identificação de algumas espécies fúngicas.</p> |

| |
|--|
| Fávido – Tipo de parasitismo piloso caracterizado pela penetração de artroconídios no interior do pêlo, deixando espaços de ar ao longo do mesmo. |
| Filogenia - genealogia entre grupos taxonômicos. É a representação da sequência com que surgiram ao longo do tempo, |
| Gavinhas - hifas que possuem circunvoluções, assumindo aspecto de espiral. |
| Geofílico - termo aplicado a fungos cujo habitat natural é o solo. |
| Glabra - pele desprovida de pêlos. Superfície lisa. |
| Glabroso - termo aplicado às colônias que possuem textura de cera ou manteiga. Frequentemente observado no grupo das leveduras. |
| Hifa - estrutura tubular de paredes paralelas; pode ser septada ou não. Quanto a coloração, classifica-se em hialinas e demácias. É a unidade estrutural dos fungos filamentosos. |
| Hifa em espiral - hifas que possuem circunvoluções, assumindo aspecto de gavinha. |
| Hifa em raquete - hifa com dilatações intercalares que assemelham-se a uma raquete de tênis. |
| Hifa estéril - hifas destituídas de estruturas de frutificação derivadas de processos assexuados bem como estruturas de ornamentação que possibilitem a correta identificação do fungo. |
| Hifa peridial – Hifas encontradas como envoltório de ascocarpos. Estas se dispõem na direção da periferia da estrutura sexuada. |
| Hifa pectinada - hifa que possui denticulações laterais semelhantes a um pente. |
| Macroconídios -o maior entre dois tipos de conídios de tamanhos diferentes produzidos pelo mesmo fungo. Geralmente é multiseptado. |
| Megaspórico -artroconídios presentes no pêlo e que possuem dimensões entre 5-10 μm . |
| Microconídios -o menor entre dois tipos de conídios de tamanhos diferentes produzidos pelo mesmo fungo. Geralmente possui apenas uma célula e formato ovóide, piriforme ou arredondado. |
| Micróide -pequenas cadeias dissociadas formadas por pequenos artroconídios em volta do pêlo. |

| |
|---|
| Microspórico- arthroconídios encontrados dentro ou fora do pêlo que possuem dimensões entre 2-4 μm . |
| Micélio: É o agrupamento de hifas. |
| Órgão nodular- estrutura resultante do entrelaçamento de uma ou mais hifas assumindo o aspecto de nó. |
| Órgão perfurador- massa organizada de hifas produzidas por algumas espécies de dermatófitos e outros fungos queratinofílicos no processo da perfuração dos cabelos <i>in vitro</i> . |
| Plasticidade microbiana- capacidade de um microrganismo alterar sua fisiologia ou morfologia de acordo com condições ambientais ou a habilidade de um genótipo produzir mais de um fenótipo quando exposto a diferentes ambientes. |
| Pleomorfismo- alterações degenerativas que ocorrem nos fungos e ocasionam a conversão das hifas com frutificação em hifas estéreis. As estruturas fúngicas que possibilitam a identificação das espécies fúngicas são perdidas, algumas vezes de maneira irreversível. |
| Pulverulento- termo referente as colônias que possuem textura com aspecto de pó. |
| Kérion – É uma infecção dermatofítica dolorosa. Nesta lesão se observa pus que sai espontaneamente ou sob pressão dos orifícios pilosos. |
| Teleomorfo- corresponde ao estado de reprodução sexuado. |
| Veludoso- termo referente as colônias que possuem textura com aspecto de tecido aveludado. |

APÊNDICE B – Artigo publicado com dados da tese

Asian Pacific Journal of Tropical Medicine – Impactor Fator 1,94, Qualis A2



Original Article
Asian Pacific Journal of Tropical Medicine

journal homepage: www.apjtm.org



doi: 10.4103/1995-7645.262567

Impact factor: 1.77

Chlamydoconidium-producing *Trichophyton tonsurans*: Atypical morphological features of strains causing tinea capitis in Ceará, Brazil

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante¹, Germana Costa Paixão¹, Jonathas Sales de Oliveira¹, Vandbergue Santos Pereira¹, Marcos Fábio Gadelha Rocha^{1,2,3}, Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto³, Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco¹, Rossana de Aguiar Cordeiro¹, José Júlio Costa Sidrim¹

¹Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Rua Nunes de Melo, 1315, Fortaleza, Brazil

²Postgraduate Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Av. Dr. Sáias Mangaba, 1700, Fortaleza, Brazil

³Department of Tropical Medicine, Center for Health Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 February 2019

Revised 15 June 2019

Accepted 5 July 2019

Available online 17 July 2019

Keywords:

Trichophyton tonsurans

Chlamydoconidia

Dermatophyte

Phenotyping

ABSTRACT

Objective: To report atypical morphological features of *Trichophyton (T.) tonsurans* strains associated with tinea capitis.

Methods: Eighty-two *T. tonsurans* strains isolated in Ceará, Brazil, were analyzed regarding macro and micromorphological features and nutritional patterns.

Results: Fifty-two samples presented abundant chlamydoconidia, which were produced in chains. Macroscopically, these strains developed small glabrous colonies that were firmly attached to the surface of the culture medium, with few or no aerial mycelia and intense rusty yellow pigmentation. Seven strains did not grow with stimulus from thiamine. Samples were heterogeneous regarding urease production and none presented *in vitro* hair perforation.

Conclusions: The observation of *T. tonsurans* strains with distinct phenotypic features indicates the need to revise the taxonomic criteria for routine identification of this dermatophyte.

1. Introduction

Dermatophytes are among the oldest microorganisms recognized as human pathogens, and are the main fungi involved in superficial mycoses^[1-3]. The incidence of infections caused by species such as *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouinii* and *Trichophyton (T.) schoenleinii* has markedly decreased in the past 100 years, while *T. tonsurans* has progressively become more important as an infectious agent, particularly causing tinea capitis^[3-10]. Also, *T. tonsurans* is the most common dermatophyte species isolated from scalp of asymptomatic carriers^[11]. In Northeastern Brazil, over the

past decades, *T. tonsurans* has been the main etiological agent of tinea capitis^[12-15], being considered an emerging pathogen.

Nowadays, dermatophyte taxonomy is under re-evaluation, because of findings based on molecular phylogenetics^[1,16,17]; and several researchers have been focusing on studying the genotypic and protein profile of these fungi^[16,18-21]. According to De Hoog *et al*^[1], although the molecular approach has been able to resolve the main issues concerning dermatophyte phylogenetic evolution,

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to reuse, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

For reprints contact: reprint@medknow.com

©2019 Asian Pacific Journal of Tropical Medicine Produced by Wolters Kluwer - Medknow. All rights reserved.

How to cite this article: Williams-ESN, Paído GC, de Oliveira JS, Pinho VS, Rocha MFG, de Lima-Neto RG, et al. Chlamydoconidium-producing *Trichophyton tonsurans*: Atypical morphological features of strains causing tinea capitis in the state of Ceará, Brazil. Asian Pac J Trop Med 2019; 12(3): 300-304.

Corresponding author: Marcos Fábio Gadelha Rocha, Rua Coronel Nunes de Melo, 1315, Rodolfo Teófilo, CEP: 50430-275, Fortaleza, CE, Brazil.
Tel: +55 85 3366-8594
E-mail: mfgrocha@ufc.br

Foundation project: This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Brazil (Grant No.: 306976/2017-4).

APÊNDICE C – Artigo publicado com dados da tese

Microbiology – Impactor Fator: 2,1380 Qualis B1

MICROBIOLOGY

RESEARCH ARTICLE

Brilhante et al., Microbiology

DOI 10.1099/mic.0.001018



Atypical chlamydoconidium-producing *Trichophyton tonsurans* strains from Ceará State, Northeast Brazil: investigation of taxonomy by phylogenetic analysis and biofilm susceptibility

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante¹, Germana Costa Paixão¹, Vandbergue Santos Pereira¹, Jonathas Sales de Oliveira¹, Juliana Maria Maciel¹, Waldemiro de Aquino Pereira-Neto¹, Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto², Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco¹, Rossana de Aguiar Cordeiro¹, José Júlio Costa Sidrim^{1*} and Marcos Fábio Gadelha Rocha^{1,3}

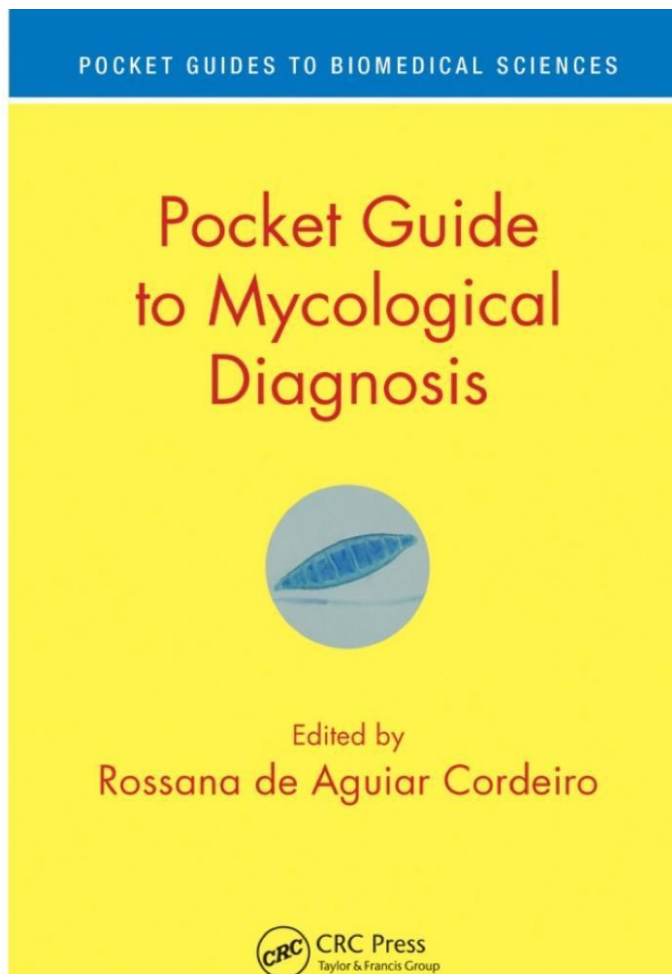


Abstract

Chlamydoconidium-producing *Trichophyton tonsurans* strains isolated in Northeastern Brazil have morphological features different from the classic description of this dermatophyte species. This study investigated the phylogenetic relationship of chlamydoconidium-producing *T. tonsurans* strains isolated in Northeastern Brazil. Also, the effect of terbinafine and farnesol on mature biofilms of *T. tonsurans* strains was evaluated. The mass spectra of *T. tonsurans* strains were investigated by matrix-

APÊNDICE D – Capítulo de Livro internacional publicado sobre o objeto da tese.

PAIXÃO, G, C; ROCHA, M.F.G; CASTELO-BRANCO, D.S.C.; BRILHANTE, R.S.N; SIDRIM, J.J.C. Dermatophytes. In: CORDEIRO, R.A (org). Pocket Guide to Mycological Diagnosis. Florida: CRC PRESS. P. 81-97. 2020.



8

Dermatophytes

Germana Costa Paixão, Marcos Fábio Gadelha Rocha, Débora de Souza Colares Maia Castelo-Branco, Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, and José Júlio Costa Sidrim

Contents

- 8.1 Historical aspects
- 8.2 Epidemiology
- 8.3 Clinical manifestations
- 8.4 Laboratory diagnosis
 - 8.4.1 Growth on special culture media
 - 8.4.2 Slide culture
 - 8.4.3 Urease production
 - 8.4.4 *In vitro* hair perforation test
 - 8.4.5 Vitamin and nutritional tests
- 8.5 DNA-based molecular identification
- 8.6 Identification based on protein profile (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight)
- 8.7 Main species of dermatophytes
 - 8.7.1 The *Microsporum* genus
 - 8.7.1.1 *Microsporum canis*
 - 8.7.1.2 *Microsporum ferrugineum*