



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**RAISSA GEOVANNA PEREIRA LOPES**

**EFEITO *IN VITRO* DA PROTEINASE K NA MATRIZ DO BIOFILME DE FUNGOS  
DERMATOFÍTICOS: UMA ANÁLISE DAS INTERAÇÕES COM TERBINAFINA E  
GRISEOFULVINA**

**FORTALEZA**

**2022**

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)

---

P495e Pereira Lopes, Raissa Geovanna.

Efeito in vitro da proteinase K na matriz do biofilme de fungos dermatofíticos : uma análise das interações com terbinafina e griseofulvina / Raissa Geovanna Pereira Lopes. – 2022.  
96 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

1. Dermatofitos. 2. Biofilme. 3. Proteinase K. 4. Matriz extracelular. 5. Sinergismo. I. Título.

CDD 610

---

RAISSA GEOVANNA PEREIRA LOPES

EFEITO *IN VITRO* DA PROTEINASE K NA MATRIZ DO BIOFILME DE FUNGOS  
DERMATOFÍTICOS: UMA ANÁLISE DAS INTERAÇÕES COM TERBINAFINA E  
GRISEOFULVINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre (a) em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

FORTALEZA

2022

RAISSA GEOVANNA PEREIRA LOPES

EFEITO *IN VITRO* DA PROTEINASE K NA MATRIZ DO BIOFILME DE FUNGOS  
DERMATOFÍTICOS: UMA ANÁLISE DAS INTERAÇÕES COM TERBINAFINA E  
GRISEOFULVINA

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos parcial para obtenção do título de Mestre (a) em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Glaucia Morgana de Melo Guedes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

A Deus.

Aos meus pais, Zildanir e Lopes.

A minha irmã Elisa Rafaella.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ser presente em minha vida, tanto nos momentos felizes quanto nos momentos difíceis, sempre protegendo a mim e aos meus familiares. A Nossa Senhora Aparecida por sua intercessão a todos que necessitam.

Aos meus pais, Zildanir e Lopes, por todo esforço em incentivar os meus estudos. Lembro-me que apesar das dificuldades em comprar os livros do colégio, tinha uma reunião para priorizar os “principais” e as outras matérias eu acompanhava pelo livro dos colegas e, nas aulas, escrevia toda a matéria abordada. Meses depois do início das aulas, eles sempre chegavam com um livro diferente do que era adotado no colégio, mas o conteúdo era semelhante ao abordado em classe. Nunca esquecerei da dedicação em educar no ensino e para a vida.

A minha irmã, Elisa Rafaella, amiga, conselheira e professora nas matérias do ensino fundamental e da vida, por sempre me apoiar, pela paciência, pela sinceridade e por me ajudar a encontrar outros caminhos em situações que eu não avistei a resolução. Você sempre foi minha inspiração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico (FUNCAP) pelo apoio financeiro aos projetos. Ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) e à Universidade Federal do Ceará (UFC) pela estrutura que proporcionou a realização desse trabalho.

À exímia Professora Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, a qual tenho profundo respeito, carinho e admiração, agradeço por ter me aceitado no Programa da Pós-Graduação em Ciências Médicas, pela confiança, pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Aos professores José Júlio da Costa Sidrim e Marcos Fábio Gadelha Rocha, que compõem o Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), e à professora Germana da Universidade Estadual do Ceará (UECE), pela dedicação à pesquisa e pelos ensinamentos compartilhados. Às professoras de Microbiologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) Débora Castelo-Branco e Rossana de Aguiar Cordeiro por exercer seu trabalho com maestria, e em especial à Prof<sup>ª</sup> Glaucia Morgana de Melo Guedes pelos conselhos, sendo um exemplo de profissional.

À Terezinha de Jesus pelas risadas e abraços aconchegantes. Aos colegas do CEMM, Jaiane, Edmilson, Lucilene, Felipe, Gleiciane Rocha, Livia Galdino, Fernando Monteiro, Raquel Collares, Santiago e aos demais colegas. À Juliana Maria Maciel, amiga de

graduação, iniciação científica e da Pós-Graduação. Em especial, Lara de Aguiar e Gessica Araújo, colegas de fluxo e amigas para vida, as quais tenho carinho e admiração, agradeço por tornar essa jornada mais leve. Ao Jonathas Sales (Jow) pela paciência, risadas e ensinamentos que me instigavam a pesquisar mais diante das dúvidas surgidas ao longo da minha graduação e pós-graduação.

Aos meus amigos, Rayane Alves, Matheus Fernandes, Alexandre Rodrigues, Laisleine Menezes, Kaik Brendon, Gabriela Casimiro, Nathalia Craveiro, Beatriz Queiroz, Thaysa Grasiely e Indyara Dias pela cumplicidade e por somar alegria ao longo desses anos, esses momentos ficaram na história.

Todos (as) vocês fazem a diferença em minha vida, serei eternamente grata!

Nascer sabendo é uma limitação, porque obriga a apenas repetir e, nunca, a criar, inovar, refazer, modificar. Quanto mais se nasce pronto, mais refém do que já se sabe e, portanto, do passado; aprender sempre é o que mais impede que nos tornemos prisioneiros de situações que, por serem inéditas, não saberíamos enfrentar.

Mario Sergio Cortella



## RESUMO

A capacidade dos dermatófitos em formar biofilme é um dos fatores de virulência capaz de potencializar a infecção. A matriz extracelular polimérica, cuja composição, como proteína, variam entre os micro-organismos, fornece um microambiente capaz de aumentar a resistência aos antifúngicos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da proteinase K na matriz extracelular polimérica dos biofilmes maduros de dermatófitos, bem como investigar a interação da proteinase K com terbinafina ou griseofulvina. Inicialmente, foi realizado teste de sensibilidade de células planctônicas, pelo método de microdiluição em caldo, com 14 cepas isoladas de origem animal e humana, sendo *Microsporium canis* (3), *Trichophyton tonsurans* (5), *Trichophyton mentagrophytes* (4), *Epidermophyton floccosum* (1) *Trichophyton rubrum* (1). Posteriormente, em microplacas de 96 poços, os biofilmes fortes formadores foram testados frente a proteinase K e com os antifúngicos, sendo avaliados por quantificação de atividade metabólica e biomassa. Depois, a proteinase K foi combinada com terbinafina ou griseofulvina ante biofilmes de *M. canis* (2) e *T. tonsurans* (2), por conseguinte, foram avaliadas por meio da atividade metabólica. A arquitetura do biofilme foi analisada pela microscopia eletrônica de varredura e confocal. Os intervalos da concentração inibitória mínima (CIM) contra a forma planctônica de dermatófitos foram >250 µg/ml para proteinase K, de 0,0078 - 0,25 µg/ml para terbinafina e 0,125 - 0,5 µg/ml para griseofulvina. Quanto à sensibilidade dos biofilmes maduros, a proteinase K à 32 µg/ml (P <0,0001) reduziu a atividade metabólica em 39% e a biomassa em 37,62%, enquanto terbinafina à 128 µg/ml (P <0,0001) reduziu a atividade metabólica em 39,9% e a biomassa em 43,5%, já a griseofulvina à 128 µg/ml (P <0,001) reduziu a atividade metabólica em 51% e a biomassa em 53,6%. As associações da proteinase K com terbinafina ou griseofulvina apresentaram efeito sinérgico (P<0,05) frente biofilme de *M. canis* e *T. tonsurans*. As imagens da microscopia eletrônica de varredura e confocal demonstraram redução do biofilme quando tratadas com a proteinase K e quando combinados com os antifúngicos. Dessa forma, esse estudo demonstra a capacidade da proteinase K em reduzir a atividade metabólica e a biomassa de biofilmes de dermatófitos, bem como seu potencial sinérgico em associação a terbinafina e griseofulvina.

**Palavras-chave:** Dermatófitos. Biofilme. Proteinase K. Antifúngicos. Matriz extracelular. Sinergismo.

## ABSTRACT

The capacity of dermatophytes to form biofilm is virulence factor that potentiates the infection. The polymeric extracellular matrix whose composition, such as protein, differs among microorganisms, provides a microenvironment capable of increasing resistance to antifungal agents. The aim of this study was the analysis of proteinase K in the matrix of mature biofilms of dermatophytes, as well as to investigate the interaction of proteinase K with terbinafine or griseofulvin. Initially, the sensitivity test of planktonic cells was performed using the broth microdilution method with 14 isolated strains of animal and human *Microsporum canis* (1), *Trichophyton tonsurans* (5), *Trichophyton mentagrophytes* (4), *Epidermophyton floccosum* (1) *Trichophyton rubrum* (1). Subsequently, on microplates, strains strong biofilms forms were tested with proteinase K and with antifungal agents, being evaluated by quantification of metabolic activity and biomass. Afterwards, proteinase K and terbinafine or griseofulvin were combined against biofilms of *M. canis* (2) and *T. tonsurans* (2), therefore, they were evaluated by means of metabolic activity. The biofilm architecture was analyzed by scanning and confocal electron microscopy. The minimum inhibitory concentration (MIC) ranges against the planktonic form of dermatophytes were  $>250 \mu\text{g ml}^{-1}$  for proteinase K,  $0.0078 - 0.25 \mu\text{g ml}^{-1}$  for terbinafine, and  $0.125 - 0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  for griseofulvin. As for mature biofilms, proteinase K at  $32 \mu\text{g ml}^{-1}$  ( $P < 0.0001$ ) reduced metabolic activity by 39% and biomass by 37.62%, while terbinafine at  $128 \mu\text{g ml}^{-1}$  ( $P < 0.0001$ ) reduced metabolic activity by 39.9% and biomass by 43.5%, whereas griseofulvin at  $128 \mu\text{g ml}^{-1}$  ( $P < 0.001$ ) reduced metabolic activity by 51% and biomass by 53.6%. The association of proteinase K with terbinafine or griseofulvin showed a synergistic effect ( $P < 0.05$ ) against biofilms of *M. canis* and *T. tonsurans*. Microscopy images showed reduced biofilm when treated with proteinase K and when combined with antifungal agents. Thus, this study demonstrates the ability of proteinase K to reduce the metabolic activity and biomass of dermatophyte biofilms, as well as its synergistic potential in association with terbinafine and griseofulvin.

**Keywords:** Dermatophytes. Biofilms. Proteinase K. Antifungals. Extracellular matrix. Synergism.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Árvore filogenética de dermatófitos baseada em sequências parciais ITS, LSU, TUB e 60S L10 .....	22
Figura 2 -	Macromorfologia e micromorfologia de <i>Microsporum canis</i> .....	23
Figura 3 -	Macromorfologia e micromorfologia de <i>Trichophyton tonsurans</i> .....	24
Figura 4 -	Macromorfologia e micromorfologia de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	24
Figura 5 -	Macromorfologia e micromorfologia de <i>Trichophyton rubrum</i> .....	25
Figura 6 -	Macromorfologia e micromorfologia de <i>Epidermophyton floccosum</i> .....	25
Figura 7 -	Lesões da dermatofitose.....	30
Figura 8 -	Lesão presente na onicomicose branca superficial e onicodistrofia total.....	31
Figura 9 -	Alopecia generalizada em gato e cão.....	32
Figura 10 -	Modelo de formação de biofilmes em fungos filamentosos.....	35
Figura 11 -	Biofilmes <i>ex vivo</i> de dermatófitos em fragmentos de unha.....	36
Figura 12 -	Fórmula estrutural do itraconazol.....	39
Figura 13 -	Fórmula estrutural da griseofulvina.....	40
Figura 14 -	Fórmula estrutural da terbinafina.....	41
Figura 15 -	Fragmento estrutural tridimensional da proteinase K.....	43
Figura 16 -	Fluxograma de execução dos experimentos.....	48
Figura 17 -	Sensibilidade <i>in vitro</i> de biofilmes de dermatófitos maduros exposto à proteinase K, terbinafina e griseofulvina.....	58
Figura 18 -	Microfotografia de biofilmes em microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de dermatófitos.....	60
Figura 19 -	Microfotografia de biofilmes em microscopia confocal a laser de biofilmes de dermatófitos.....	61

Figura 20 -	Mapa das interações entre proteinase K e terbinafina ou griseofulvina em biofilme de <i>Microsporum canis</i> .....	63
Figura 21 -	Mapa das interações entre proteinase K e terbinafina ou griseofulvina em biofilme de <i>Trichophyton tonsurans</i> .....	64
Figura 22 -	Microfotografia de biofilmes de dermatófitos tratados com proteinase K e terbinafina ou griseofulvina em microscopia confocal a laser.....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Origem das espécies de dermatófitos utilizadas nos testes de sensibilidade.....	49
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima da terbinafina, griseofulvina e proteinase K em espécies de dermatófitos na forma planctônica.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – *Acquired immunodeficiency syndrome*

ALP – Aspartato aminotransferase

ALT – Alanina aminotransferase

ATCC – *American Type Culture Collection*

CEMM – Centro Especializado em Micologia Médica

CFM – Concentração fungicida mínima

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute*

Da – Dalton

DMSO – Dimetilsufóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

eDNA – Ácido desoxirribonucleico extracelular

GRV- Griseofulvina

HIV – *Human immunodeficiency virus*

HMDS – Hexametildisilazano

ITS – *Internal Transcribed Spacer*

MALDI-TOF – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight*

MEC – Matriz extracelular exopolimérica

MTT – 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide

NaOH – Hidróxido de sódio

PBS – *Phosphate-buffered saline*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PDA – *Potato Dextrose Agar*

PK – Proteinase K

rDNA- Ácido desoxirribonucleico ribossômico

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

TRB – Terbinafina

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C Graus Celsius

μm Micrômetro

h Hora

% Porcentagem

mg Miligrama

g Grama

ml Mililitro

> Maior que

< Menor que

μl Microlitro

μg Micrograma



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	Aspectos históricos dos dermatófitos.....	20
2.2	Aspectos morfológicos dos dermatófitos.....	23
2.3	Epidemiologia.....	26
2.4	Patogenia da dermatofitose.....	27
2.5	Apresentações clínicas da dermatofitose.....	29
2.6	Métodos empregados no diagnóstico das dermatofitoses.....	32
2.6.1	<i>Diagnóstico micológico</i> .....	32
2.6.2	<i>Identificação molecular e proteica dos dermatófitos</i> .....	33
2.7	Fatores de virulência .....	34
2.7.1	<i>Biofilme</i> .....	34
2.7.1.1	<i>Matriz extracelular polimérica do biofilme</i> .....	36
2.8	Tratamento farmacológico da dermatofitose.....	38
2.8.1	<i>Derivados azólicos</i> .....	38
2.8.2	<i>Griseofulvina</i> .....	39
2.8.3	<i>Terbinafina</i> .....	40
2.9	Prospecção de compostos com potencial degradante de biofilme.....	42
2.9.1	<i>Proteinase K</i> .....	42
3	MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE/EFEITO SOBRE FUNGOS/DERMATÓFITOS.....	44
4	HIPÓTESES.....	46
5	OBJETIVOS.....	47
5.1	Objetivo geral.....	47
5.2	Objetivos específicos.....	47
6	METODOLOGIA.....	48
6.1	Desenho do experimento.....	48
6.2	Local do estudo.....	49
6.3	Micro-organismos.....	49
6.4	Drogas.....	50
6.5	Inóculo.....	50
6.6	Teste de sensibilidade planctônica.....	50
6.7	Formação <i>in vitro</i> de biofilme.....	51

6.8	Teste de sensibilidade dos biofilmes.....	51
6.9	Interações da proteinase K com antifúngicos em biofilmes de dermatófitos.....	52
6.10	Análises microscópicas do biofilme <i>in vitro</i> de dermatófitos.....	53
6.11	Análises estatísticas.....	54
7	<b>RESULTADOS</b> .....	55
7.1	Sensibilidade planctônica nos dermatófitos.....	55
7.2	Sensibilidade em biofilmes maduros de dermatófitos.....	57
7.3	Microscopia dos biofilmes maduros de dermatófitos tratados com proteinase K.....	59
7.4	Interações da proteinase K com terbinafina ou griseofulvina.....	62
7.5	Microscopia dos biofilmes maduros de dermatófitos tratados com proteinase K associados a terbinafina ou griseofulvina.....	65
8	<b>DISCUSSÃO</b> .....	67
9	<b>CONCLUSÃO</b> .....	72
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	73
	<b>APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO</b> .....	96
	<b>APÊNDICE B – RESUMO DO ARTIGO SUBMETIDO COM OS DADOS DA DISSERTAÇÃO</b> .....	97

## 1 INTRODUÇÃO

Os dermatófitos são fungos filamentosos, hialinos, queratinofílicos, capazes de causar patologias em homens e animais (AGRAWAL; NANDEIBAM; DEVI, 2021). Estudos epidemiológicos mostram que a distribuição de dermatófitos isolados de espécimes clínicos sofreram mudanças, tendo como fatores contribuintes para essas alterações, as condições socioeconômicas e climáticas de cada região (EBRAHIMI et al., 2019).

Desse modo, espécies que eram frequentemente isoladas, como *Epidermophyton floccosum* e *Trichophyton schoenleinii* tiveram reduções nas incidências (WANG et al., 2020) à medida que outras espécies vêm se destacando com aumento na taxa de isolamento laboratorial, como *Trichophyton tonsurans*, principal causador da *tinea capitis*, foi relatado no Reino Unido, na França, na Índia, nos Estados Unidos e no Japão, sendo considerado um patógeno emergente (GRAY et al., 2015; HIRUMA et al., 2015; BHAT et al., 2017; VINGATARAMIN et al., 2019). No Brasil, o estado do Ceará se destaca com a incidência de *Trichophyton tonsurans*, espécie mais isolada em *tinea capitis*, em um período maior que duas décadas (BRILHANTE et al., 2000; BRILHANTE et al., 2021).

Além disso, há relatos de casos de pacientes com dermatofitose crônica, ocasionado principalmente pelas espécies de *Trichophyton interdigitale* e *Trichophyton rubrum*, causando *tinea corporis* e *tinea cruris* (TIGGA et al., 2018; SOORIYA et al., 2021). O segundo agente causador mais comumente isolado nas dermatofitoses é *Trichophyton mentagrophytes*, ficando apenas atrás do *Trichophyton rubrum*. (SARIYANTI; AGUSTRIA; HERLAMBANG et al., 2021). Já em relação aos fungos zoofílicos, destaca-se *Microsporium canis*, principal patógeno em animais domésticos que pode ser transmitido para os humanos (MINNAT, T. R.; KHALF et al., 2019; RAMOS et al., 2020).

O diagnóstico da dermatofitose é embasado em sintomas clínicos, e a espécie fúngica é confirmada por meio da identificação de características morfológicas realizada em laboratório (ARAYA; TESFAYE; FENTE, et al., 2020). As *tineas*, lesões da dermatofitose, dependendo da localização e da extensão, podem causar sofrimento social e emocional aos pacientes (RAJAGOPALAN et al., 2018; BAGHEL et al., 2020), sendo a identificação desse fungo fundamental para estabelecer o controle e a prevenção das dermatofitoses, além de determinar as terapias antifúngicas mais adequadas (RASHIDIAN et al., 2015; GNAT et al., 2021).

Apesar dos tratamentos disponíveis, em alguns países, o surgimento de novos casos e de recorrência dessa infecção se tornou um problema de saúde pública (NWEZE; EKE, 2018; PEREIRA, et al., 2020; RENGASAMY, et al., 2020). Estudos apontam aumento na incidência de casos de dermatofitose crônica e recorrentes sem resposta ao tratamento aos antifúngicos, como fluconazol e terbinafina (DOGRA; UPRETY, 2016; JOSHI et al., 2020).

A recidiva e casos crônicos está relacionada a falha no tratamento em decorrência ao uso indiscriminado de medicamentos, a fatores relacionados ao hospedeiro e a fatores de virulência dos dermatófitos, como a capacidade de formar biofilme que pode potencializar a infecção e induzir um estado inflamatório crônico no hospedeiro (PANDA et al., 2017).

A capacidade de formação do biofilme de dermatófitos e a tolerância comparado a forma planctônica foram demonstrados *in vitro* e *ex vivo* (BRILHANTE et al., 2018; CASTELO-BRANCO et al., 2020). Essa comunidade microbiana envolvida por uma matriz extracelular dificulta a ação de drogas, bem como confere proteção contra a resposta imune do hospedeiro (NARDONI, et al., 2013). A utilização de agentes enzimáticos como a proteinase K vem se destacando devido à ação potencial de alvos nos componentes da matriz extracelular polimérica, visto que os integrantes, como as proteínas, são essências para conferir estabilidade ao biofilme (KIM; LIM; KIM, 2019).

Outrossim, a proteinase K, uma serina protease, tem apresentado ser capaz de reduzir a biomassa em biofilmes, *in vitro*, de *Staphylococcus aureus* (SHUKLA et al., 2013) e de *Helicobacter pylori* (HATHROUBI et al., 2020), e a associação da proteinase K com outros antimicrobianos e com outras enzimas, como DNase I em biofilme multiespécies oral tem sido eficaz em potencializar o efeito de outros agentes e, por conseguinte, reduzir o biofilme (SHUKLA et al., 2017; KARYGIANNI; ATTIN; THURNHEER, 2020).

Sendo assim, foi avaliado o efeito da proteinase K contra as células planctônicas e os biofilmes maduros de dermatófitos, bem como sua interação com drogas antifúngicas (terbinafina e griseofulvina) contra biofilmes maduros, contribuindo, dessa forma, na compreensão da heterogeneidade da composição da matriz extracelular polimérica, bem como a proteção que ela confere contra antimicrobianos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos históricos dos dermatófitos

O primeiro relato de infecção causada por dermatófito foi descrita por Aulus Cornelius Celsus, enciclopedista romano, em sua obra “De Re Medicina” por volta de 30 D.C., o qual descreveu uma infecção com lesões supurativas no couro cabeludo que, posteriormente, veio a ser conhecida como “*Kerion de Celsus*” (ROSENTHAL, 1961). Todavia, o início da micologia médica relacionada à doença humana começou com a descoberta da etiologia fúngica do “*Favus*”, em meados do século XIX (GÖTZ, 1978).

Em 1839, um médico polonês, Robert Remak, lecionava na Faculdade de Medicina da Universidade de Berlim e observou hifas em crostas de lesões fávicas conhecida como “*Favus*”, elucidando sua etiologia (AJELLO, 1974; SEELIGER, 1985). David Gruby, em 1842, redescobriu o agente etiológico do “*Favus*”, clinicamente e com detalhes microscópicos, e, então, criou o gênero *Microsporum* e reafirmou a etiologia de todas as tinhas (GRÄSER; DE HOOG; KUIJPERS, 2000).

Por volta de 1890, o dermatologista francês, Raymond Jacques Adrien Sabouraud, iniciou os estudos com dermatófitos, culminando, em 1910, na publicação de seu volume clássico *Les Teignes*, representando um marco na Micologia Médica (ESPINEL-INGROFF, 2003). As pesquisas realizadas por Sabouraud contribuíram na taxonomia, na morfologia, nos métodos para cultivo e no tratamento das dermatofitoses, possibilitando a classificação dos dermatófitos em quatro gêneros: *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; SIDRIM et al., 2004).

Durante décadas, surgiram inúmeros conceitos e novos padrões metodológicos, com o aparecimento de novas espécies, resultando em vários táxons que recentemente são considerados sinônimos de espécies anteriormente descritas (ESFIDANI et al., 2018; SU et al., 2019). Em meados de 1950, era possível encontrar cerca de 350 nomes para as mais diversas espécies de dermatófitos (DE HOOG et al., 2017).

Em 1934, o micologista Chester Emmons modificou os critérios taxonômico vigente na época, estabelecendo a atual classificação dos dermatófitos com base na morfologia dos conídios e na capacidade de crescimento em meios de cultura especiais, que retirou o gênero *Achorion* e o reenquadrou dentro do gênero *Trichophyton*, reconhecendo, assim, apenas os gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (NEGRONI, 2010; GRÄSER et al., 2018).

Em 1962, Stockdale, Dawson e Gentles retomaram o gênero *Arthroderma* e criaram o gênero *Nannizzia*, demonstrando isolados na forma perfeita (teleomórfica) de dermatófitos geofílicos, zoofílicos e não patogênicos (DAWSON; GENTLES, 1962; STOCKDALE, 1962). Entretanto, Stockdale redescobriu espécies aparentemente anamórficas, mas que poderiam apresentar reprodução sexuada, pois naquele instante os pesquisadores não haviam acreditado na existência de reprodução sexuada desse fungo, mesmo como os trabalhos elaborados por Nannizzi que, em 1927, com cepa isolada do solo de *Microsporum gypseum* obteve cleistotécios, surgindo, assim, uma nova incógnita na classificação (STOCKDALE, 1968).

Por conseguinte, os dermatófitos com capacidade de reprodução sexuada do gênero *Trichophyton* passaram a ser realocados no gênero *Arthroderma*, e do gênero *Microsporum* foram denominados de *Nannizzia*. Weitzman et al. (1986) consideraram *Nannizzia* e *Arthroderma* com características morfológicas semelhantes e uniram em um gênero *Arthroderma*. Desde 2013, após a elaboração da Declaração de Amsterdã de nomenclatura fúngica, resultante de dois congressos ocorridos em Amsterdã, Holanda, a classificação conforme os estágios sexuais (teleomorfos) ou assexuais (anamorfos) foi abolida (DE HOOG et al., 2015).

Com base em seu habitat, esses fungos podem ser divididos em três grupos, sendo eles: antropofílicos, zoofílicos e geofílicos. Os antropofílicos possuem afinidade por humanos, os zoofílicos possuem afinidade por animais, como cães e gatos, porém podem ocasionalmente infectar humanos, e os geofílicos vivem no solo rico em materiais com queratina em decomposição, podendo ser transmitidos aos humanos e animais por meio do contato com o solo (FERGUSON; FULLER, 2017).

As análises macroscópicas das colônias e microscópicas das estruturas de frutificação (macroconídios e microconídios) e de ornamentação (hifas em espiral) auxiliam na identificação laboratorial dos isolados fúngicos, entretanto, tem se tornado laborioso manter e reproduzir estas características devido à rapidez de pleomorfismo apresentado por alguns dermatófitos, podendo gerar variações fenotípicas, inclusive, em uma mesma espécie e que pode contribuir para novas denominações de espécie já catalogadas. Assim, diante da dificuldade de identificação dos sintomas clínicos e a plasticidade fenotípica, Weitzman et al., em 1983, elaborou a prova nutricional ou ágar *Trichophyton* (T1 a T7) que considera os requerimentos nutricionais das diferentes espécies de dermatófitos para fins taxonômicos (DE HOOG et al., 2017).

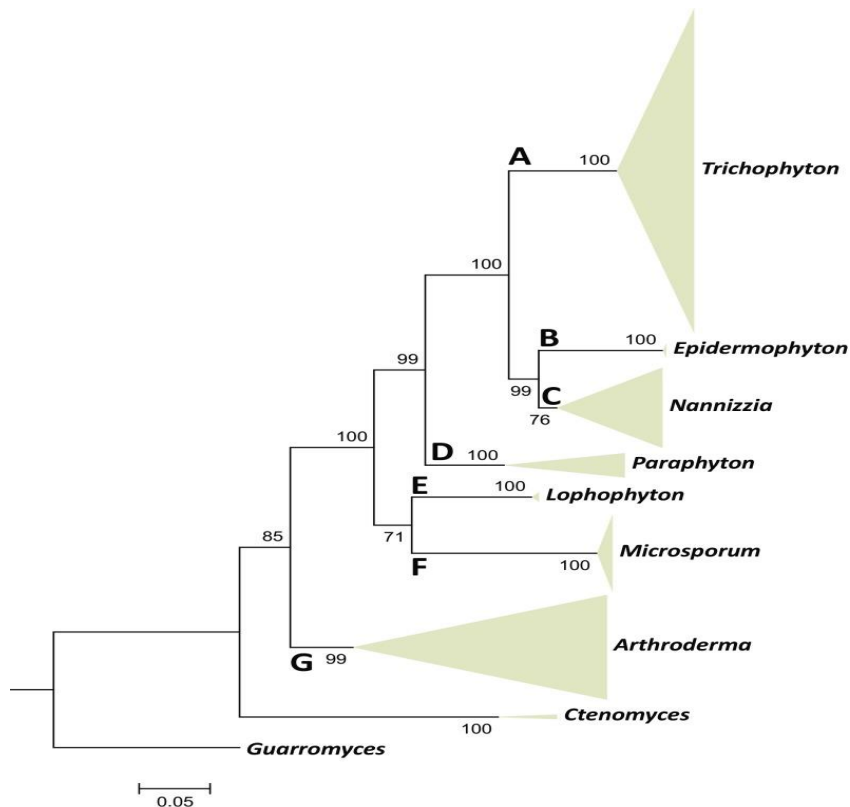
Por meio de técnicas moleculares, novas identificações de micro-organismos foram descobertas, todavia várias classificações vêm sendo apresentadas para os dermatófitos,

ocasionando divergências taxonômicas (CAFARCHIA et al., 2013; FAROKHIPOR et al., 2018; HEDAYATI et al., 2019). Assim, foi observado que algumas espécies de *Chrysosporium* são intercaladas entre as espécies de *Trichophyton* spp. geofílicos, sugerindo que a identificação das espécies baseadas nas características morfológicas pode gerar erros, diante da aproximação genética entre esses gêneros (GRÄSER et al. 2008).

Desse modo, a partir da análise molecular algumas espécies que eram classificadas como únicas por meio da avaliação morfológica foram identificadas como espécies diferentes e vice-versa (GNAT et al., 2017). Isso foi identificado entre espécies *T. rubrum* e *T. violaceum*, o qual foi demonstrado ITS (*Internal Transcribed Spacer*) idênticos no DNA ribossomal (rDNA), tubulina e rDNA 60S L10, sendo debatido a possibilidade de representarem a mesma espécie com fenótipos diferentes (ZHAN et al., 2018).

Dentre as revisões da taxonomia está a classificação dos dermatófitos por meio da análise multi-loci de sequências parciais de ITS e LSU, TUB e 60S L10, com mais de 50 espécies distribuídas em 7 clados (Figura 1), nos gêneros *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Paraphyton*, *Lophophyton*, *Microsporium* e *Arthroderma* (DE HOOG et al., 2017; ZARESHAHRABADI et al., 2020).

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



Fonte: De Hoog et al., 2017.

Apesar da descrição dos 7 gêneros, os dermatófitos queratinofílicos capazes de causar patologias em homens e animais, seguindo a definição do termo correspondem aproximadamente a 30 espécies classificadas nos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* sendo as outras espécies alocadas em grupo correlacionado, mas que não é considerado um dermatófito (COULIBALY et al., 2018; SHABAA, 2020). Assim, a classificação taxonômica muda conforme aos estudos moleculares aplicados.

## 2.2 Aspectos morfológicos dos dermatófitos

Os dermatófitos são fungos filamentosos, queratinofílicos, com colônias cultivadas à temperatura de 25 a 28 °C por até 28 dias (CZAIKA; LAM, 2013; AGUILAR, et al. 2017; ROBATI et al., 2018). As observações das características macroscópicas das colônias e dos aspectos microscópicos das estruturas de frutificação e de ornamentação auxiliam na caracterização micológica, todavia nos dermatófitos a apresentação dessas características pode ser laboriosa devido ao rápido polimorfismo (DE HOOG et al., 2017). Desse modo, dentre a caracterização da morfologia dos dermatófitos estão:

*Microsporum canis* com colônias de relevo apiculado (Figura 2A), textura algodoadosa, coloração do verso branco e reverso de coloração amarelo (Figura 2B). Microscopicamente, possuem muitos macroconídios e poucos microconídios. Os macroconídios tem a forma navicular ou fusiforme (Figura 2C), divididos por septos transversais, podendo variar de 8 a 15 septos, e apresentam em sua superfície protuberâncias com aspecto verrucoso ou equinulado (SIDRIM et al., 2004; GNAT; ŁAGOWSKI; NOWAKIEWICZ; ZIĘBA, 2018).

Figura 2 - Macromorfologia e micromorfologia de *Microsporum canis*.



Legenda: A: Macromorfologia do crescimento de *Microsporum canis*, em meio ágar batata após 15 dias de crescimento. B: Macromorfologia do reverso da colônia de *Microsporum canis*. C: Micromorfologia de *Microsporum canis* corados com lactofenol azul de algodão. Presença de macroconídios naviculares e microconídios sésseis. Fonte: CEMM, 2021.



*Trichophyton tonsurans* com colônia de relevo apiculado com coloração do verso variando de branco (Figure 3A) a acastanhado e reverso castanho-avermelhado (Figure 3B). Na microscopia (Figure 3C) apresenta numerosos microconídios piriformes e poucos macroconídios em forma de clava (MOCHIZUKI et al., 2013; TORRES-GUERRERO et al., 2015).

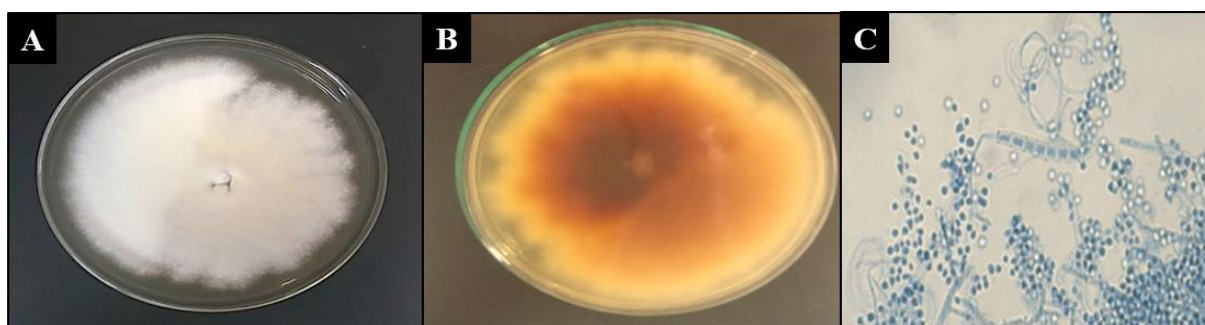
Figura 3 - Macromorfologia e micromorfologia de *Trichophyton tonsurans*.



Legenda: A e B: Macromorfologia do crescimento de *Trichophyton tonsurans*, em meio ágar batata (A) e ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (B), após 15 dias de crescimento. C: Micromorfologia de *Trichophyton tonsurans* coradas com lactofenol azul de algodão. Presença de pouco macroconídio e muito microconídio piriforme. Fonte: Trovato et al., 2019; Yáñez, 2019.

Complexo *Trichophyton mentagrophytes/T. interdigitale* com colônia de textura pulverulenta (Figure 4A) e coloração de branco-amarelo ao creme-bege. O reverso pode apresentar variação do amarelo-castanho ao castanho-avermelhado (Figure 4B). Na microscopia apresenta muitos microconídios e poucos macroconídios (Figure 4C). Quando presentes, os macroconídios apresentam características lisas, geralmente finas paredes e 1 a 12 septos. Essas estruturas podem ser encontradas isoladamente ou em grupos, em forma de clava ou arredondada (HOHAUS; VENNEWALD; WOLLINA, 2003; CHOLLET et al., 2015).

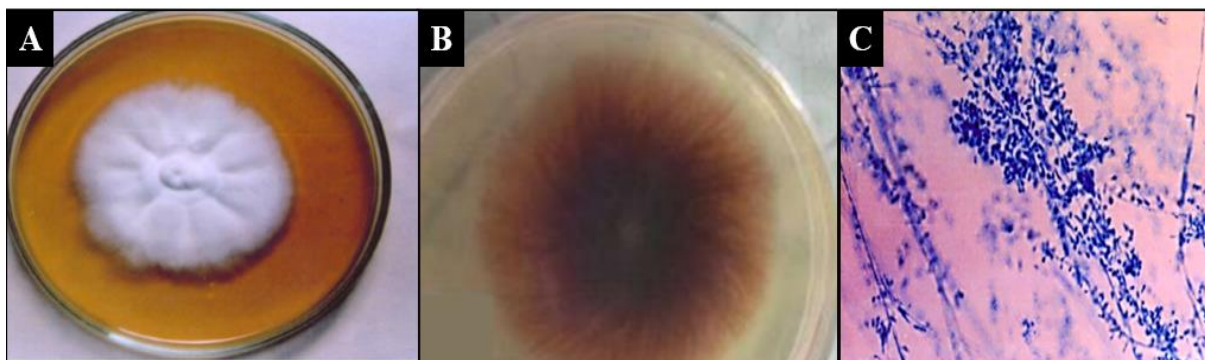
Figura 4 - Macromorfologia e micromorfologia de *Trichophyton mentagrophytes*.



Legenda: A: Macromorfologia do crescimento de *Trichophyton mentagrophytes*, em meio ágar batata após 15 dias de crescimento. B: Macromorfologia do reverso da colônia de *Trichophyton mentagrophytes*. C: Micromorfologia de *Trichophyton mentagrophytes* coradas com lactofenol azul de algodão. Presença de pouco macroconídio e muito microconídio ovalados. Fonte: Czaika; Lam, 2013 e CEMM, 2021.

*Trichophyton rubrum* com colônia de textura algodonosa (Figura 5A) ou velutosa com coloração branco, com reverso apresentando coloração avermelhada (Figura 5B), podendo em algumas cepas observar diferentes tonalidades de castanho. Microscopicamente, apresenta microconídios que se apresentam regulares e piriformes, em grande quantidade, dispostos em *acladium* (Figura 5C). Os macroconídios, presentes eventualmente, são variáveis em número, tamanho e de forma cilíndrica (SIEDE, 2018).

Figura 5 - Macromorfologia e micromorfologia de *Trichophyton rubrum*.



Legenda: A: Macromorfologia do crescimento de *Trichophyton rubrum*, em meio ágar batata. B: Macromorfologia do reverso da colônia de *Trichophyton rubrum*. C: Micromorfologia de *Trichophyton rubrum* coradas com lactofenol azul de algodão. Presença de muitos microconídios piriformes. Fonte: Reddy, 2017; CEMM, 2021.

*Epidermophyton floccosum* com colônia de textura pulverulenta (Figura 6A), coloração branco e reverso castanho-amarelado (Figura 6B). Os macroconídios em forma de clava tem septos finos e paredes lisas (Figura 6C), de um a nove septos, podendo estar agrupado em cachos. Microconídios estão ausentes (REDDY, 2017).

Figura 6 - Macromorfologia e micromorfologia de *Epidermophyton floccosum*.



Legenda: A: Macromorfologia do crescimento de *Epidermophyton floccosum*, em meio ágar batata após 15 dias de crescimento. B: Macromorfologia do reverso da colônia de *Epidermophyton floccosum*. C: Micromorfologia de *Epidermophyton floccosum* coradas com lactofenol azul de algodão. Presença de macroconídios em forma de clava. Fonte: CRUZ; CARVAJAL, 2018; CEMM, 2021.

## 2.3 Epidemiologia

A transmissão da dermatofitose pode ocorrer através do contato direto de humanos e animais infectados, ou indireto por meio de objetos contaminados, principalmente os compartilhados, como toalhas, alicates de unhas e escova de cabelo, ou por meio de solos contaminados (MORIELLO et al., 2017). Sendo essa doença contagiosa e algumas espécies apresentam-se como zoonótica, além disso, a distribuição das espécies difere conforme a região geográfica, as condições socioeconômicas, a migração e as alterações no estilo de vida, com maior incidência nos países tropicais devido às altas temperaturas e umidade (GUO et al., 2012; BONTEMS, 2020; LEUNG et al., 2020).

Estima-se que as dermatofitoses afetam cerca de 20% a 25% da população mundial (PETRUCCELLI et al., 2020). Dentre os indivíduos infectados por dermatófitos, em torno de 30 a 70% dos adultos são assintomáticos (BATHIA, 2019). Estima-se que cerca de 80% das infecções humanas por *M. canis* nas áreas rurais e 10% em áreas urbanas são oriundas de animais (PAL; MAHENDRA, 2017). Cães e gatos destacam-se por serem reservatórios para infecção e reinfecção de dermatofitose, favorecendo, desse modo, a transmissão tanto para os humanos como para outros animais, sendo *M. canis* e *Trichophyton mentagrophytes* as espécies mais isoladas (SIĞIRCI et al., 2019; BEGUN et al., 2021; HARIU et al., 2021). Na Indonésia, 34% dos cães testaram positivos para dermatofitose, já na Europa, a incidência em cães e gatos variam de 20 a 30%, e na Itália a variação da doença foi de 7,5% a 20,5% em cães e 24,7 a 33,3% em gatos (GALUPPI et al., 2013; INDARJULIANTO et al., 2014).

Na Europa as espécies de maior incidência de dermatófitos em humanos são *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *E. floccosum* e *M. canis*, geralmente relacionados a surtos epidêmicos (MARAKI, S.; MAVROMANOLAKI, 2016). No sul da Ásia, a Índia passa por uma epidemia ocasionada por *T. mentagrophytes*, isso representa uma mudança na espécie prevalente nos últimos 20 anos, demonstrando pacientes com lesões mais inflamatórias e com predileção na face quando comparado às lesões ocasionadas pelo *T. rubrum*, antes patógeno mais isolado nessa região (NENOFF et al., 2019).

Outros dermatófitos são encontrados em regiões específicas, como *Microsporum ferrugineum* na Ásia, *Trichophyton megninii* na Europa e *Trichophyton concentricum* na América do Sul (MAROÑAS JIMÉNEZ et al., 2014; ZHAN; LIU, 2017). Mesmo com especificidade dessas espécies em cada região, *T. rubrum* continua sendo um dos mais isolados prevalentes em seres humanos, podendo essa característica estar relacionada a uma alta transmissibilidade quando comparados aos dermatófitos antropofílicos (GAMAGE et al.,

2020), exceto na África onde existe uma variedade de dermatófitos em cada microrregião, sendo *Microsporium audouinii* e *T. sudanense* as espécies mais comuns (COULIBALY et al., 2018).

No Brasil, há maior incidência de infecções nas regiões sul e sudeste por *T. rubrum*, *M. canis* e *T. mentagrophytes*. Na região Nordeste, por sua vez, as espécies *T. tonsurans*, *T. rubrum* e *M. canis* são mais prevalentes (SILVA-ROCHA; AZEVEDO; CHAVES, 2017). No Ceará, entre as espécies de dermatófitos, *T. tonsurans* vem se destacando como mais isolado em *tinea capitis* desde 2000, configurando, desse modo, como patógeno emergente (BRILHANTE et al., 2019; BRILHANTE et al., 2021). Também foi relato pela primeira vez no Brasil, *tinea corporis* por *Arthroderma benhamiae*, dermatófito zoofílico, em criança de 19 meses, diagnosticado por meio da análise de sequenciamento ITS (DE FREITAS et al., 2019).

Logo, há uma modificação no panorama das espécies patogênicas mais isoladas nos países ao longo dos anos (EBRAHIMI et al., 2019), e a detecção das espécies de dermatófitos possibilita o rastreamento das fontes de infecção, incluindo animais assintomáticos, que tem 50% de chance em infectar pessoas quando expostas aos animais infectados, além de auxiliar na escolha do tratamento adequado e orientação na descontaminação do ambiente, visto que foi possível isolar do chão, da parede e dos tapetes *M. canis* em residências de animais com dermatofitose, consequentemente, isso pode auxiliar na redução de casos de infecções recorrentes, contendo, dessa maneira, a proliferação da dermatofitose e contribuindo no controle de epidemias (KUPSCH et al., 2016; RAD et al., 2018; DA CUNHA et al., 2019).

## 2.4 Patogenia da dermatofitose

A pele tem a função de revestimento, termorregulação, proteção contra agentes externos, como bactérias e fungos, e até mesmo contra aos fatores ambientais (raios ultravioletas) (PARK, 2015). Entretanto, diferentes de outros fungos, os dermatófitos degradam queratina, principal constituinte presente no estrato córneo de humanos e animais, sendo a instalação e a evolução clínica associada à liberação de enzimas (queratinase, lipase, elastase e DNAses) produzidas em diferentes concentrações, demonstrado *in vitro* pelos isolados dermatófitos de animais com e sem lesões cutâneas e de humanos (MERCER; STEWART, 2019; BONCI et al., 2021).

A capacidade dos dermatófitos em produzir enzimas, como queratinases, adesinas, lipases, fosfatases, colagenase, desoxirribonuclease (DNAses) e proteases não específicas, representam função essencial para que esse fungo possa invadir o estrato córneo da pele de

humanos e animais, obter nutrientes e superar o sistema imunológico do hospedeiro (MARTINEZ-ROSSI et al. 2012; BORAL et al., 2018). Gnat et al. (2018) demonstraram em estudos realizados com 234 dermatófitos isolados clínicos de animais e humanos que 96% produziam fosfolipase e todos as cepas produziram queratinase, enzima necessária na fase de adesão, enquanto a elastase, enzima que desempenha a indução de lesões cutâneas em humanos, foi produzida por apenas 23% dos isolados, sugerindo que o perfil de enzimas características de espécies ou gêneros possivelmente é dependente de fatores relacionados ao hospedeiro.

Em análise de 7 cepas de dermatófitos, foram catalogados mais de duzentos tipos de proteases, sendo observado conservação nos genes de sequenciamento das proteases, porém a liberação enzimática no meio ocorre de forma variável entre as espécies (SRIRANGANADANE et al., 2011). O pH ácido da pele (entre 4,75 e 5,75) estimula os dermatófitos a ativarem a via dependente dos fatores de transcrição sensorial, como PacC, que auxiliam na adaptação desses fungos ao pH ácido, ocorrendo no primeiro momento a degradação de queratina por meio do processo de sulfitólise, diante do alto teor de cisteína que favorece a resistência da pele e anexos (unhas, pelos, cascos), seguida da ação da queratinase. Assim, os metabólitos de alguns aminoácidos, como a glicina, resultam na liberação de amônia e alteração do pH da pele do meio de ácido para alcalina, entre 7,5 e 8,9 que, por sua vez, favorece a ativação de proteases funcionais em meio alcalinas (SHARMA; SHARMA; RAO, 2011; AL JANABI; AL KHIKANI, 2020).

Sendo assim, a adesão dos dermatófitos no estrato córneo do hospedeiro devem ocorrer rapidamente (dentro 3 a 4 h) para evitar a eliminação de fungos (ZURITA; HAY, 1987; FAWAY; LAMBERT DE ROUVROIT; POUMAY, 2018). Baldo et al. (2010) apresentaram que em *M. canis* a protease secretada pela Sub3, família da subtilisina, é envolvida na adesão e não na invasão da epiderme felina, demonstrando que as proteases também têm função de ancoragem nos tecidos do hospedeiro.

Com a instalação do processo infeccioso pelo agente etiológico da dermatofitose, as lesões clínicas crescem de forma centrífuga, ocasionando uma lesão vesicular conhecida como herpes circinada que pode confluir e gerar placas policíclicas, além disso, em animais e humanos, fatores mecânicos, principalmente arranhões e mordeduras de cães e gatos predisõem para a invasão da doença (SIDRIM et al., 2004; TAINWALA; SHARMA, 2011). Desse modo, a progressão dessa lesão pode ocasionar a invasão nos pelos, resultante do aprofundamento em direção ao infundíbulo piloso (RICHARDSON, 2005), e as formas clínicas variam de acordo com o agente etiológico e da relação parasita-hospedeiro (GNAT, et al., 2020).

Em humanos, a dermatofitose é mediada pela resposta imune através das células Th1 e Th17, responsáveis pela eliminação do patógeno na dermatofitose aguda, enquanto na dermatofitose crônica, a imunidade responsável é a via das células Th2, demonstrando elevados níveis de imunoglobulina E (IgE) e imunoglobulina G (IgG) (VERMOUT et al. 2008). Já pacientes com dermatofitose recorrente têm reduções nos interferon (IFN)- $\gamma$ , Th1, interleucina (IL)-17 e das células Th17, e aumento na interleucina (IL)-4 e nos níveis séricos de imunoglobulina E (IgE), associado a imunidade desregulada, fatores como o uso prévio de corticosteroides tópicos, compartilhamento de objetos contaminados entre os membros da família, predis põem para *tinea* recorrente (BONGOMIN et al., 2017; JHA et al., 2021).

## 2.5 Apresentações clínicas da dermatofitose

Os aspectos clínicos das lesões dermatofíticas são diversas e derivam da combinação de destruição da queratina associada a uma resposta inflamatória que pode ser intensa ou não, dependendo da interação do binômio parasito/hospedeiro (BARANOVÁ et al., 2018). Dessa maneira, a variação clínica da lesão está correlacionada a três fatores, são eles, espécie, sítio anatômico e estado imunológico do hospedeiro (NNAGBO; ANYAMENE; ANYIAM, 2021).

Há duas formas de classificação clínica das dermatofitoses, uma segue a corrente inglesa, denominando todas as infecções de *tinea* associada ao sítio anatômico acometido em latim (GINTER-HANSELMAYER; NENOFF, 2018). Em relação a outra denominação clínica, segue a corrente francesa e classifica as dermatofitoses em *tinea*, lesões do couro cabeludo, barba e bigode; epidermofitíases, lesões da região da pele glabra; onicomicose, lesões que acomete a unha; dermatofitoses subcutâneas e profundas, lesões que acometem o tecido subcutâneo ou órgãos profundos (SIDRIM et al., 2004).

Na clínica, *tinea* tonsurante ou *tinea capitis* acomete principalmente crianças no período escolar, caracterizado por lesões no couro cabeludo com um ou mais regiões de alopecia (HAINER, 2003). Na puberdade, essas lesões tendem à cura espontânea caso não seja realizado o tratamento (HARRISON; SINCLAIR, 2003). Quando essa lesão é fluorescente à lâmpada de Wood, pode tratar-se de uma lesão microspórica (Figura 7A) relacionada ao dermatófito do gênero *Microsporum*, devido ao metabólito do triptofano, a pteridina. Entretanto, o teste positivo é apenas sugestivo e não diagnóstico, pois a luz ultravioleta reage também diante infecções bacterianas, como as causadas por *Cutibacterium acnes*; alterações



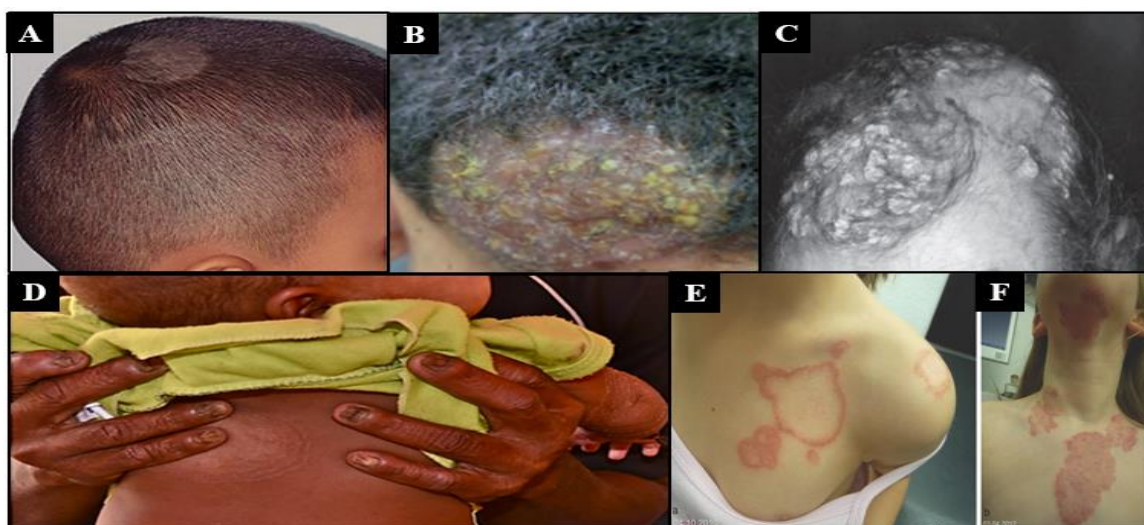
pigmentares, como melasma; e porfiria (MORIELLO et al., 2017; VEASEY, MIGUEL, BEDRIKOW, 2017; MOHTA et al., 2020).

*Tinea supurativa* (Figura 7B) ou *tinea capitis* acomete indivíduos de qualquer idade, essa lesão é conhecida como “*Kerion de Celsus*”, caracterizada pelo surgimento de placas com secreção purulenta, perda de cabelos ou pelos, podendo ser observado caminho serpentinoso (SIDRIM et al., 2004; TORRES-GUERRERO et al., 2015; VEASEY; MUZY, 2018).

*Tinea fávica* ou *tinea capitis* tem como característica a formação de líquido seroso em torno do pelo, causando prurido e formando uma crosta amarelada com odor de urina de rato (Figura 7C) (VEASEY; MUZY, 2018).

As epidermofitíases podem ser divididas em *tinea corporis*, lesões de grandes pregas, lesões interdigitoplantares/interdigitopalmares e *tinea imbricata* ou Tokelau (SAHOO; MAHAJAN, 2016; LEUNG et al., 2020). *Tinea corporis* acomete crianças e adultos, caracterizada por lesão única ou múltipla (Figura 7E), descamativa com vesículas na periferia (LEUNG et al., 2020). Com relação às lesões de grandes pregas, geralmente, começam na parte interna da coxa que podem confluir e formar placas maiores que se estendem para a região posterior (HAINER, 2003). As lesões interdigitoplantares ou *tinea pedis* e interdigitopalmares ou *tinea manuum* são lesões localizadas nos espaços interdigitais, as quais podem ser desidróticas, vesículas escamativas, ou hiperqueratóticas difusa das regiões medial, lateral e plantar (KIRAZ et al., 2010; ILKIT; DURDU, 2015). A *tinea imbricata* (Figura 7D) ou Tokelau apresenta uma ou várias lesões, formado círculo descamativo com diâmetro variável, podendo cobrir grandes áreas do corpo (SAHOO; MAHAJAN, 2016).

Figura 7- Lesões da dermatofitose.



Legenda: A: *Tinea tonsurante* causada por *Microsporum canis*. B: *Tinea supurativa* com placa escamosa com intenso processo inflamatório local. C: *Tinea fávica* causada por *Trichophyton schoenleinii* com placa escamosa

com intenso processo inflamatório local. D: *Tinea imbricata* causada por *Trichophyton concentricum* com placas concêntricas e escamosas na região posterior e no braço direito em criança com 1 ano de idade. E e F: *Tinea corporis* com lesões de crescimento centrífugo mostram clareamento central (E) e com lesões inflamatórias com placas eritemato-escamosas de crescimento centrífugo (F). Fonte: Zaraa, 2012; Nenoff et al., 2014; Veasey; Muzy, 2018; Leung; Leong; Lam, 2019; Vargas-Navia et al., 2020.

Outrossim, as onicomicoses dermatofíticas ou *tinea unguium* acometem as unhas das mãos e dos pés (HAINER, 2003). A onicomicose subungueal distal acomete a borda livre da unha tornando-a espessa e opaca, quanto a onicomicose subungueal proximal acomete a borda proximal e apresenta característica semelhante a onicomicose subungueal distal (GROVER; KHURANA, 2012; LEUNG et al., 2020). No que concerne à onicomicose branca superficial ou leuconicomicose superficial, a coloração branca apresenta-se, principalmente, na região medial da unha (Figura 8A) (LEUNG et al., 2020). As evoluções dessas lesões podem acarretar em onicodistrofia total caracterizada pela unha fica frágil e queda das lâminas ungueais (Figura 8B) (LEUNG et al., 2020).

Figura 8 - Lesão presente na onicomicose branca superficial e onicodistrofia total.



Legenda: A: Onicomicose branca superficial causada por *Trichophyton rubrum* com placas esbranquiçada. B: Onicodistrofia causada por *Trichophyton rubrum*. Fonte: Peixoto et al., 2010 e Lipner e Scher, 2019.

Além dessas dermatofitose, há as formas disseminada, crônica, recorrente e profundas, como granuloma de Majocchi e pseudomicetoma dermatofítico (SAHOO; MAHAJAN, 2016). Essas dermatofitoses geram lesões cutâneas crônicas de difícil tratamento, contribuindo também para um declínio na qualidade de vida do paciente, atingindo a autoestima (NARANG et al., 2019).

Nos casos de dermatofitose em animais, as lesões são variáveis, com sintomas clínicos mais comuns: alopecia, eritema e prurido (Figura 9) (BAJWA, 2020). As lesões causadas por dermatófitos em cães tende a acometer com maior frequência as regiões da face, do tronco e dos membros (CUNHA et al., 2019); em gatos, destacam-se lesões na face e parte distal dos membros com característica inflamatória e descamativa (PAL; MAHENDRA et al., 2017).



Figura 9 - Alopecia generalizada em gato e cão.



Legenda: Queda de pelo em gato (A) e em cão (B) com dermatofitose ambos ocasionados por *Microsporum canis*. Fonte: Boehm; Mueller, 2019; Bajwa, 2020.

## 2.6 Métodos empregados no diagnóstico das dermatofitoses

Os métodos convencionais comumente utilizados para o diagnóstico micológico baseiam-se na identificação de características macromorfológica e micromorfológica da colônia, ademais, testes fisiológicos e bioquímicos podem ser aplicados para auxiliar no diagnóstico (VERRIER; MONOD, 2017). Diante da plasticidade fenotípica, a combinação com uso de técnicas moleculares e análise proteica possibilita a diferenciação de cepas intraespécies, surgindo como um potencializador de identificação da fonte de infecção, da distinção entre recorrência e reinfecção, e da determinação de terapias antifúngicas adequadas (KANBE, 2008; PIHET; LE GOVIC, 2017; FRÍAS-DE-LEÓN et al., 2020).

### 2.6.1 Diagnóstico micológico

No exame direto, as amostras podem ser tratadas com hidróxido de potássio (KOH 10 - 40%) ou hidróxido de sódio (NaOH 10 - 30%) para clarificação das estruturas queratinizadas (SINGH et al., 2020). A microscopia direta auxilia no diagnóstico da infecção fúngica, todavia é preciso conciliar com o isolamento da cultura (VERRIER; MONOD, 2017).

A cultura é considerada o padrão ouro para o diagnóstico da dermatofitose. Para isso, espécimes clínicos são incubados a 28 °C e mantidos por no mínimo 2 semanas em meio ágar Sabouraud simples, ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e/ou ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida (SIDRIM et al., 2004; VERRIER; MONOD, 2017).

A identificação morfológica tem como base características macroscópicas (cor, textura e relevo) e microscópicas (estruturas de frutificação e de ornamentação) (DE HOOG et al., 2017). Em alguns casos também podem ser utilizados outros testes para auxiliar no diagnóstico, como microcultivo, prova da urease para diferenciar *T. mentagrophytes* (hidrolisa

a ureia) e *T. rubrum* (não hidrolisa a ureia) em meio ágar ureia de Christensen, teste de perfuração de pelo e provas de requerimentos vitamínicos por meio do enriquecimento dos meios de cultura com ácido nicotínico, tiamina, histidina e inositol, sendo a base do ágar T1 ao T5 a caseína e do ágar T6 e T7 o nitrato de amônia, ou seja, T1 (ágar base caseína), T2 (ágar base caseína com inositol), T3 (ágar base caseína com tiamina e histidina), T4 (ágar base caseína com tiamina), T5 (ágar base caseína com ácido nicotínico), T6 (ágar base nitrato de amônia) e T7 (ágar base nitrato de amônia com histidina) (SIDRIM et al., 2004; KADHIM et al., 2018).

### **2.6.2 Identificação molecular e proteica dos dermatófitos**

O diagnóstico molecular dos dermatófitos está associado à extração e ao sequenciamento do ácido desoxirribonucleico (DNA), como o codificador de rDNA 5.8S, apresentando maior sensibilidade e especificidade, além do menor tempo para a identificação do agente etiológico, tornando possível distinguir diferentes gêneros e espécies, sendo úteis para uma determinação precisa (VERRIER; MONOD, 2017). Essa Identificação de espécies de dermatófitos por sequenciamento de DNA, já é viável também por meio de kit molecular, como o identificador do ribossômico 28S (GNAT et al., 2017).

Além disso, os dermatófitos podem então ser identificados por técnicas baseadas em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) convencional e PCR em tempo real, com a utilização de *primers* pan-dermatófitos, como PandermF e PanDerm2, ou *primers* específicos para identificar espécies de dermatófitos, como Trubrum-ver e Trubrum-F para identificação de *T. rubrum* (BERGMAN et al., 2013; L'OLLIVIER et al., 2013; VERRIER; MONOD, 2017).

Outra técnica promissora para a identificação de micro-organismo é a espectrometria de massa de tempo de voo de dessorção/ionização assistida por matriz (MALDI-TOF), este método usa a impressão digital característica de uma proteína para identificar um micro-organismo específico, combinando padrões de proteína específicos da espécie que são armazenadas em uma biblioteca de espectros de referência (L'OLLIVIER et al., 2013). Apesar desses métodos facilitarem a rápida detecção e identificação de dermatófitos quando comparado ao tempo da cultura, ainda tem alguns obstáculos, como a escassez de perfis proteicos depositado no banco de dados e elevado custo para implementação e manutenção na rotina do laboratório (ROBERT et al., 2021).

## 2.7 Fatores de virulência

### 2.7.1 Biofilme

Os biofilmes são comunidades microbianas aderidas a um substrato biótico ou abiótico, que crescem envoltos por uma matriz extracelular polimérica (SHEPPARD; LYNNEHOWEL, 2016). A matriz é constituída por polissacarídeos, lipídeos, proteínas e DNA extracelular, secretados pelas células sésseis (HU et al., 2018). Essa comunidade apresenta maior tolerância aos antimicrobianos em comparação com células planctônicas e está relacionada à persistência de infecções (FANNING; MITCHELL, 2012).

A capacidade dos micro-organismos em formar biofilme possibilita a proteção contra o ambiente, a resistência diante estresses físicos e químicos, a cooperação metabólica e a regulação da expressão gênica (RAMAGE et al., 2012). Nos seres humanos, os biofilmes microbianos representam até 80% das infecções bacterianas e fúngicas (HØIBY, 2017). Na clínica, os biofilmes representam um desafio para o tratamento de infecções, visto que esse fator de virulência protege os micro-organismos de ataques do sistema de defesa do hospedeiro e aumenta a resistência microbiana (SAXENA et al., 2019).

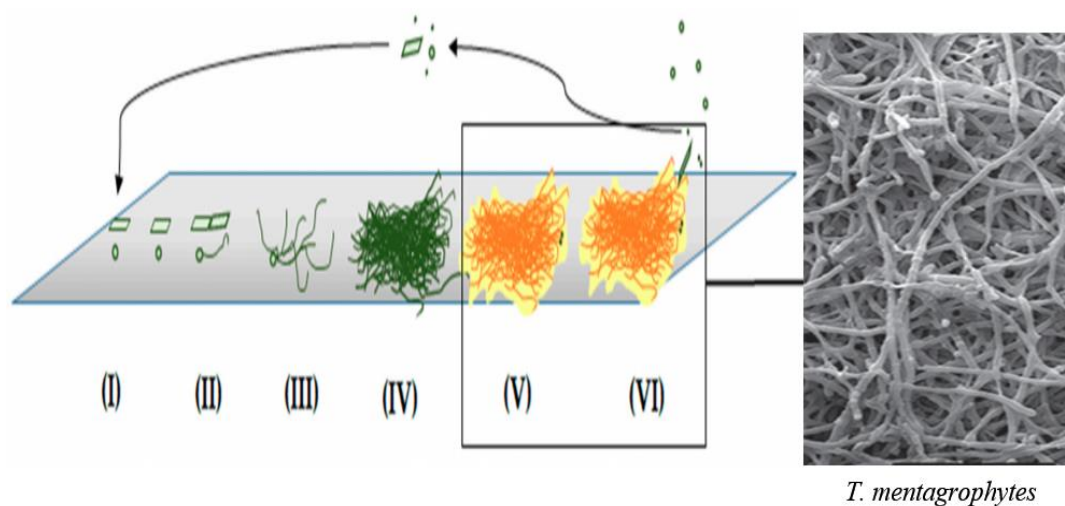
Desse modo, houve um aumento no interesse em estudar os biofilmes microbianos, nas últimas décadas, no escopo de esclarecer os mecanismos envolvidos que implica na cronicidade de algumas doenças (DEL POZO, 2018). Já foi relatado diversas infecções crônicas incluindo pneumonia, infecções do trato urinário e infecção no cateter venoso central relacionados a formação de biofilme (DIACONU et al., 2018; IKRAM et al., 2019; ZALEWSKA-PIĄTEK; PIĄTEK, 2020).

Costa-Orlandi et al. (2014) demonstrou a capacidade dos dermatófitos em formar biofilme *in vitro*, nas espécies: *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Dentre as manifestações clínicas da dermatofitose, alguns autores sugerem que os casos de recidivas e cronicidades da onicomicose em pacientes podem estar associados à formação do biofilme na região ungueal, contribuindo, desse modo, para o aumento da resistência antifúngica (BURKHART et al. 2002; GUPTA; FOLEY, 2018).

Os estágios de desenvolvimento de biofilmes de fungos filamentosos (Figura 10) envolvem as seguintes etapas: (I) adsorção; (II) adesão ativa, envolvendo contato de conídios ou fragmentos de hifas em uma superfície, na qual as adesinas são secretadas durante germinação e outras estruturas reprodutivas; (III) formação da primeira microcolônia que envolve alongamento e ramificação de hifas com produção de matriz extracelular; (IV) maturação inicial em que redes compactas de hifas, recobertas por matriz extracelular e

formação de canais de água para passagem de nutrientes e remoção de resíduos; (V) maturação final, fase em que estruturas de frutificação são formadas dependendo do fungo; (VI) a dispersão ou fase planctônica, na qual conídios e/ou fragmentos de hifas são liberados, iniciando um novo ciclo (COSTA-ORLANDI et al., 2017).

Figura 10- Modelo de formação de biofilmes em fungos filamentosos.

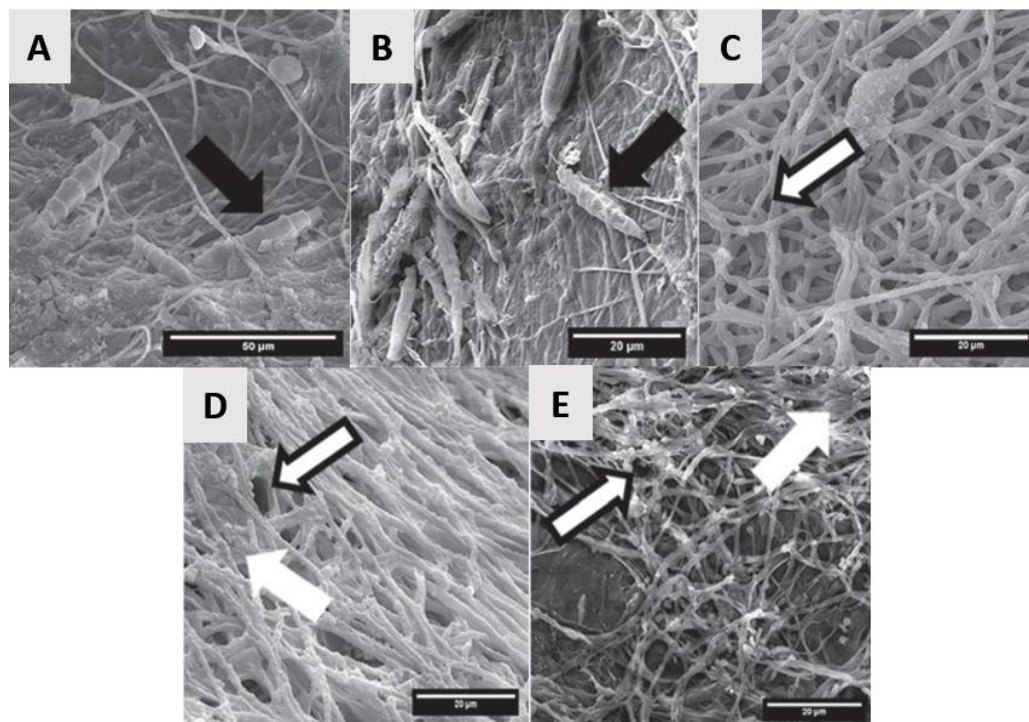


Legenda: (I) Adsorção, (II) Adesão, (III) Formação de microcolônia 1, (IV) Maturação, (V) Desenvolvimento do biofilme maduro, (VI) Dispersão. Fonte: Costa-Orlandi et al., 2017; Brilhante et al., 2018.

Além disso, as células do biofilme possuem a capacidade de comunicar e de coordenar sua ação por meio de moléculas de sinalização que se acumulam durante seu crescimento denominado *quorum sensing* (WONGSUK; PUMEESEAT; LUPLERTLOP, 2016). Esse mecanismo de sinalização depende da densidade de células microbianas, e quando essas moléculas, denominada de autoindutores, atingem um limite crítico, uma resposta ocorre, resultando na expressão ou na repressão de genes, viabilizando a regulação de diferentes comportamentos microbianos, como morfogênese, patogênese e formação de biofilme (RODRIGUES; ČERNÁKOVÁ et al., 2020).

Estudos de Brilhante et al. (2018) demonstraram que os dermatófitos das espécies de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes* foram capazes de formar biofilmes tanto *in vitro* quanto *ex vivo*, e por meio de análises microscópicas foi possível observar que os biofilmes são constituídos por uma densa camada de hifas entrelaçadas e conídios recobertos por matriz extracelular polimérica (MEC). Esses biofilmes apresentaram tempo de maturação de 72h *in vitro* e 21 dias no *ex vivo* (Figura 11). Estudos utilizando modelos *in vitro* e *ex vivo* demonstraram que a adesão dos artroconídios aos queratinócitos dependem do fator tempo, além de apresentarem biofilmes diferentes (BRILHANTE et al., 2017).

Figura 11- Biofilmes *ex vivo* de dermatófitos em fragmentos de unha.



Legenda: Biofilme de dermatófitos, formado sobre fragmentos de unha analisado por microscopia eletrônica de varredura. As cinco espécies são (A) *M. canis*, (B) *M. gypseum*, (C) *T. rubrum*, (D) *T. tonsurans*, (E) *T. mentagrophytes*. As setas pretas mostram macroconídios, setas brancas mostram a matriz extracelular polimérica e setas brancas com bordas pretas destacadas mostram os canais de águas. Fonte: Brilhante et al., 2018.

Brilhante et al. (2018) e Castelo-Branco et al. (2020) apresentaram em estudo, *in vitro* e *ex vivo*, a diminuição na responsividade às drogas antifúngicas em biofilme quando comparado a forma planctônica dos dermatófitos. Dessa forma, diante da proteção e da resistência que o biofilme confere ao micro-organismo, faz-se necessária a busca por novas estratégias que visem à inibição desse patógeno.

### 2.7.1.1 Matriz extracelular polimérica do biofilme

Os biofilmes são ligados às superfícies biótica ou abiótica por meio de uma matriz extracelular polimérica, também atua como barreira protetora para os micro-organismos dentro do biofilme contra o sistema imune do hospedeiro, bem como, confere resistência aos antifúngicos e ao estresse do ambiente, contribuindo, desse modo, para a patogenicidade (KARYGIANNI; ATTIN; THURNHEER, 2020).

Em estudos realizados na matriz do biofilme de *Candida albicans* foi observado que os polissacarídeos consistiam em 39,6%, as proteínas em 5,0%, a hexosamina em 3,3%, o fósforo em 0,5% e o ácido urônico em 0,1%, no mesmo estudo a matriz de biofilmes de *C.*

*tropicalis* apresentaram com principalmente constituinte a hexosamina, representando em 27,4%, os polissacarídeos em 3,3%, as proteínas em 3,3% e o fósforo em 0,2% (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006).

Zarnowski et al. (2014) analisaram a composição da matriz extracelular polimérica de *Candida albicans* demonstrando que os constituintes representam 55% de proteínas, 25% de carboidratos, 15% de lipídeos e 5% de ácido nucleicos, enquanto  $\beta$ -1,3-glucano representava uma pequena porção da totalidade da matriz. Contudo, as composições da matriz extracelular variam entre os biofilmes fúngicos, mesmo quando submetidos às mesmas condições de crescimento (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Embora o componente mais abundante da matriz extracelular polimérica do biofilme de algumas cepas de *Candida albicans* sejam as proteínas, ainda pouco se sabe sobre o papel de cada uma delas (THOMAS; BACHMANN; LOPEZ-RIBOT et al., 2006; MARTÍNEZ-GOMARIZ et al., 2009). Diante das inúmeras proteínas, acredita-se que a função delas na matriz extracelular polimérica possa funcionar também como um sistema de degradação para obtenção de nutrientes, conforme fora demonstrado em bactérias, além de estruturar biofilmes e ainda auxiliar na dispersão do biofilme (SUTHERLAND, 2001; ROMANÍ et al., 2008; CHEN et al., 2013).

Foi demonstrado divergências macromoleculares entre a parede celular e a matriz extracelular polimérica, como na matriz extracelular de *C. albicans*, um componente abundante de alto peso molecular de aproximadamente 12.000 de  $\alpha$ -1,2-ramificado  $\alpha$ -1,6 manana. Esses polissacarídeos são, aproximadamente 10 vezes maiores do que as mananas encontradas na parede celular de *C. albicans*, sendo capazes de formar ligações manana-glucano, complexo que está associado a resistência antifúngica (ZARNOWSKI et al., 2014; MITCHELL et al., 2015). Além disso, os biofilmes de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. auris*, também demonstraram capacidade de formar essa ligação de polissacarídeos (DOMINGUEZ et al., 2018; DOMINGUEZ et al., 2019).

Os componentes em menor concentrações são lipídios e ácidos nucleicos. A função dos lipídios, como fosfolipídios, esfingolipídios e eicosanoides, durante a formação do biofilme continua sendo uma incógnita (LATTIF et al., 2011). Já o DNA extracelular presente na matriz parece fornecer informações que ajudam na composição estrutural e na proteção contra agressões externas, incluindo alguns antifúngicos (MARTINS et al., 2010).

Assim, a matriz extracelular envolve as estruturas dos biofilmes dos fungos, e diante desses componentes serem os primeiros a entrarem em contato com o meio externo, como leucócitos dos hospedeiros e os antifúngicos (XIE et al., 2012), torna essencial descobrir

a quantificação dos componentes e suas funções na patogenicidade do biofilme. Desse modo, até o presente momento, não há estudos que quantificassem os componentes da matriz extracelular polimérica do biofilme de dermatófitos.

## **2.8 Tratamento farmacológico da dermatofitose**

Alguns fármacos são utilizados no tratamento da dermatofitose humana e animal, dentre eles, derivados azólicos, alilaminas (terbinafina) e griseofulvina (SINGH et al., 2020), sendo também utilizada associação entre medicamentos de ação sistêmica e tópica (MORIELLO et al., 2017; GNAT, et al. 2020). A escolha do tratamento da dermatofitose deve ser orientada conforme a localização da infecção, a espécie envolvida e as preferências do paciente (PIRES et al., 2014; GUPTA; FOLEY; VERSTEEG, 2017), pois a dificuldade no tratamento da dermatofitose também está relacionada ao diagnóstico tardio, ao tratamento de longa duração, à desistência da terapia pelos pacientes, à reinfeção por meio de fômites, bem como outros fatores inerentes ao agente etiológico e hospedeiro (DOGRA; UPRETY, 2016).

### **2.8.1 Derivados Azólicos**

Os derivados azólicos são divididos em dois grupos: imidazólicos e triazólicos. Esses fármacos têm como alvo a enzima 14 $\alpha$ -demetilase (Erg11p), um componente importante no processo de biossíntese do ergosterol (HOF, 2006; LEPESHEVA; WATERMAN, 2007). Os derivados azólicos ligam-se ao Erg11p, diminuindo, desse modo, os níveis de ergosterol e aumentando a permeabilidade da membrana celular fúngica (BERKOW; LOCKHART, 2017).

Os imidazólicos, como miconazol, clotrimazol, cetoconazol, econazol, bifonazol, tioconazol e oxiconazol, podem ocasionar, dentre os efeitos adversos, constipação, dor de cabeça, hepatite, prurido e exantema (GOGTAY; KULKARNI; PANCHABHAI, 2008; UNNI; JOSEPH, 2019).

Os triazólicos, como fluconazol, voriconazol, itraconazol (Figura 12) são antifúngicos eficazes tanto em micoses sistêmicas como superficiais, podem também ocasionar efeitos adversos, como sonolência, náusea e dor abdominal (SHALINI et al., 2011; PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

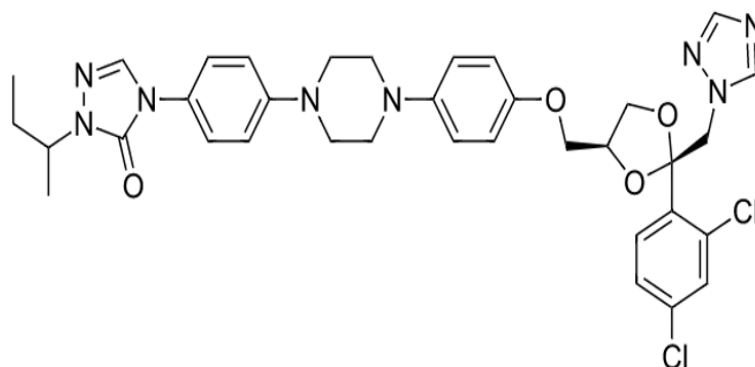


Figura 12: Fórmula estrutural do itraconazol. Fonte: Shalini et al. (2011).

Tem sido relatada cura de lesões causadas pelo gênero *Trichophyton* por meio da utilização de imidazólicos, como o cetoconazol, e os triazólicos, como o itraconazol (ROANA et al., 2021). Nos casos de *tinea corporis* e *cruris*, o itraconazol com dose 200 mg - 400 mg / dia tem sido utilizada nos casos recalcitrantes e graves com tratamento duração de tratamento no de no mínimo 4 semanas (RAJAGOPALAN et al., 2018).

Na veterinária, pode ser utilizado o cetoconazol tópico em cães e gatos para lesões únicas, e em múltiplas lesões pode se fazer uso de itraconazol, sendo essa a droga de preferência na dermatofitose felina, bem tolerado pelos gatos, com eficácia igual ou superior do que cetoconazol ou griseofulvina, sendo contraindicado o uso do itraconazol em animais com doença hepática, gestantes ou lactantes (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2012; FRYMUS et al. 2013).

### 2.8.2 Griseofulvina

A griseofulvina foi isolada em 1939, a partir do *Penicillium griseofulvum*, entretanto a utilização clínica só foi viabilizada em 1958 (PETERSEN et al., 2014). Essa droga possui atividade fungistática que se distribui até o bulbo piloso unindo-se às células da queratina recém-formadas (KASSEM et al., 2006; CHATTERJI et al, 2011). Ela tem ação sistêmica, age por meio da inibição da mitose fúngica por ligação com os microtúbulos fúngicos (DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2018).

Sua administração é por via oral, tendo sido descrito alguns efeitos adversos, como: náuseas, vômitos, diarreia, hepatotoxicidade e leucopenia (DASTGHAIB; AZIZZADEH; JAFARI, 2005). Apesar dos vários efeitos adversos, a griseofulvina (Figura 13) é a droga de escolha mais usada na *tinea capitis* (CHEN et al., 2016).



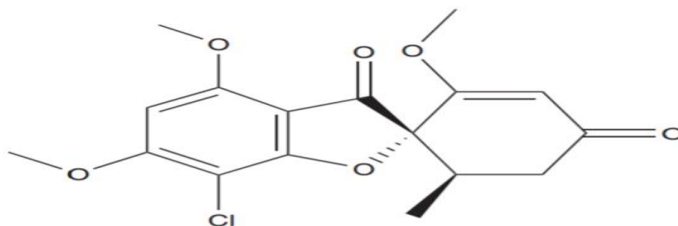


Figura 13: Fórmula estrutural da griseofulvina. Fonte: CHATTERJI et al. (2011).

Em estudos realizados por Mikaeili et al. (2019) foi observado que em 33 pacientes com *tinea capitis* tratados com griseofulvina resultaram na cura de 90,9% dos pacientes. O tratamento em pacientes pediátricos com *tinea capitis* demonstraram cura da doença com a dose de 20mg/kg/dia em um período de 8 a 12 semanas (BAR et al., 2019). Entretanto, há falhas terapêuticas relacionadas a essa droga, em cepas isoladas do gênero *Trichophyton* de pacientes com históricos recidivas ou novos casos, as CIM's foram de 32 µg/ml, sendo considerada a droga menos eficaz *in vitro* quando comparada às drogas fluconazol, voriconazol, itraconazol, cetoconazol, sertaconazol, clotrimazol, terbinafina, naftifina, amorolfina, ciclopirox olamina e luliconazol, porém nenhum mecanismo foi elucidado (RUDRAMURTHY et al. 2018).

Na veterinária, a griseofulvina tem sido utilizada em dose oral de 25-50 mg/kg associada com outras drogas de uso tópico, como miconazol e enilconazol, com cura entorno de 41 a 70 dias, sendo contraindicado em animais com disfunções hepática, infecções retrovirais em felinos, leucopenia, anemia, grávidas, por causa do risco teratogênico, principalmente nas primeiras semanas de gestação (MORIELLO, 2004; NARDONI et al., 2013). Ademais, griseofulvina também possui propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias, sendo capaz suprimir reações de hipersensibilidade e reações irritantes na pele (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2012).

### 2.8.3 Terbinafina

É uma alilamina (Figura 14) com apresentações tópica e oral considerada um medicamento de primeira linha para o tratamento de *tinea corporis*, *cruris* e *unguium*, é uma droga bem tolerada e com baixo potencial de interações medicamentosas (NEWLAND; ABDEL-RAHMAN, 2009; GUPTA et al, 2020). A atuação desse fármaco é na inibição da enzima esqualeno epoxidase, responsável pela síntese de ergosterol, desempenhando atividade fungicida (GOKHALE; KULKARNI, 2000; MAJID; SHEIKH; KANTH; HAKAK, 2016).

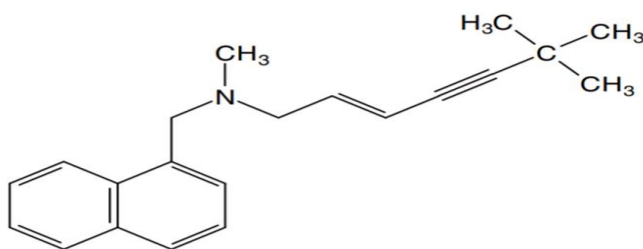


Figura 14: Fórmula estrutural da terbinafina. Fonte: DARKES; SCOTT; GOA (2003).

Os efeitos adversos incluem náuseas, vômitos e dor abdominal (TEY; TAN; CHAN, 2011). Além disso, erupções cutâneas, dores de cabeça e vertigens também foram relatadas e, dentre os efeitos adversos raros estão hepatotoxicidade, neutropenia, agranulocitose e pancitopenia (CONJEEVARAM et al., 2001; MADDY; TOSTI, 2018).

A terapia combinada, com duas ou mais drogas, tem sido utilizada para superar a resistência dos patógenos ante os medicamentos, em estudos realizados por Sharma et al. (2020) avaliaram a associação entre terbinafina e itraconazol demonstrando cura de 90% em comparação à monoterapia do itraconazol com 50% e terbinafina com 35% de cura no tratamento da dermatofitose, sendo que a combinação não apresentou efeitos adversos significativos quando comparados a monoterapia.

Na Índia tem sido relatado casos de pacientes com resistência a terbinafina com CIMs que variaram de 1 a >32 µg/ml, devido às ocorrências de mutações pontuais na enzima esqualeno epoxidase com mudança no Leu393Phe, Phe397Leu, Phe415, His440, sendo essas substituições de aminoácidos resultante de alterações conformacionais na enzima que diminui a afinidade do fármaco (SINGH et al., 2018).

Iwaskiene et al. (2016) demonstraram a eficácia da terbinafina em felinos, recuperados em 20 dias da dermatofitose em comparação ao econazol recuperados em 28 dias, ambos de uso tópico, além disso, relataram efeitos colaterais na pele, sendo eles, irritação e vermelhidão que desapareciam em algumas horas após a aplicação do econazol. Ademais, pode ser usado por fêmeas gestantes e têm poucas drogas que possam ter interações com esse fármaco, entre elas está a cimetidina que aumenta a concentração na corrente sanguínea, enquanto a rifampicina diminui sua concentração, sendo recomendado o monitoramento das enzimas hepáticas antes do tratamento e durante, no intervalo de 2 a 4 semanas da terapia, devido ao aumento de aspartato aminotransferase (ALP) e alanina aminotransferase (ALT) que sua utilização pode acarretar (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2012).

Apesar da disponibilidade de antifúngicos para tratamentos nos casos de dermatofitoses, tem sido relatado casos de dermatofitose crônica com cepas resistentes a

terbinafina e a griseofulvina (WINGFIELD, et al., 2004; GUPTA, et al., 2009; GU et al., 2020). Ademais, estima-se que a resistência por derivados azólicos em dermatófitos possa atingir cerca de 19% (GHANNOUM, 2016).

Com o aumento de casos de cepas resistentes aos antifúngicos, as utilizações de enzimas surgem como uma estratégia promissora, pois possibilita a interrupção do biofilme ou, até mesmo, a avaliação da composição e da função das macromoléculas que formam a matriz extracelular polimérica (DONLAN, 2001; THALLINGER, et al., 2013; DOGRA; UPRETY, 2016).

## **2.9 Prospecção de compostos com potencial degradante de biofilme**

A aplicabilidade das enzimas com capacidade de desestruturar o biofilme requer formulações que sejam degradantes de alvos em um ou mais constituintes da matriz extracelular, como DNA microbiano, polissacarídeos, proteínas e moléculas de detecção de *quorum sensing* (YANG et al., 2012; LI et al., 2017). Foi demonstrado a capacidade da DNase I em degradar DNA extracelular tanto *in vitro* como *in vivo* (ZHAO et al., 2018), no combate de biofilmes de *C. albicans* (MARTINS et al., 2012), *S. aureus* (WARYAH et al., 2017) e *Burkholderia pseudomallei* (PAKKULNAN et al., 2019).

Outras enzimas, como proteinase K e lisozima, demonstraram atividade antibiofilme em *Pseudomonas aeruginosa* (ELADAWY et al., 2020). As combinações de enzimas com agentes antimicrobianos podem fornecer uma potencial estratégia no tratamento contra infecções associadas ao biofilme (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2017; KIM et al., 2019; ELADAWY et al., 2020). Além disso, a utilização enzimática vem auxiliando na quantificação dos componentes da matriz extracelular polimérica do biofilme, bem como inferir a importância desses compostos na patogenicidade da infecção (KARYGIANNI; ATTIN; THURNHEER, 2020).

### **2.9.1 Proteinase K**

A proteinase K (Figura 15) é uma serina protease alcalina produzida pelo fungo *Engyodontium album*, anteriormente conhecido como *Tritirachium album*, importante nos setores industrial, agrícola e biotecnológica, como componentes de degradação de proteínas em pós para lavanderia, indústria de processamento de alimentos e medicamentos para a preparação

de cremes proteolíticos e implantes de colágeno (GHÉCZY; KÜCHLER; WALDE, 2016). A enzima monomérica tem 278 aminoácidos e massa molecular de 28.930 Da (dalton), tem ampla atividade de clivagem peptídica, quebrando ligações em terminais C-, e estabilidade em alterações de temperaturas e no intervalo entre 3 - 11 de pH (JASMIN et al., 2010; KOUPAEI et al. 2016).

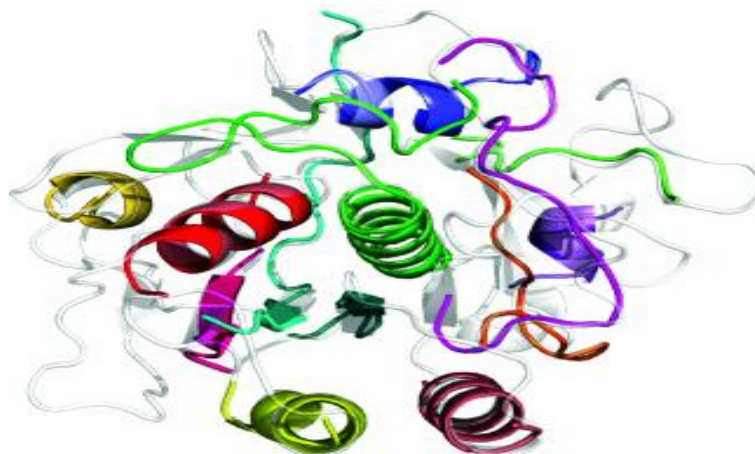


Figura 15: Fragmento estrutural tridimensional da proteinase K. Fonte: RICHARDS (2020).

Na biologia molecular, a proteinase K vem sendo amplamente utilizada na purificação de ácidos nucleicos (DNA e RNA), na remoção de endotoxinas ligadas às proteínas catiônicas, como lisozima e ribonuclease (FERREIRA; MONTEIRO; PRAZERES; CABRAL, 2000; FARRELL; ROBERT, 2006), na determinação da localização da enzima em membranas (WU et al., 2003), na degradação de proteínas de amostras de tecido cerebral (YAMAKAWA et al., 2003) e em *footprint* de protease para revelar interações de superfície proteína-proteína (SILVERMAN et al., 2014).

Além do mais, o tratamento, *in vitro*, no biofilme com proteinase K tem demonstrado a capacidade de reduzir a biomassa em biofilmes, dentre eles, *Candida* spp. (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006), *Staphylococcus aureus* (SHUKLA et al., 2013) e *Helicobacter pylori* (HATHROUBI et al., 2020). Em biofilme multiespécies oral de *Actinomyces oris*, *Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans* e *Veillonella dispar* ante combinação enzimática da proteinase K e Dnase I demonstraram ser capazes de desestruturar o biofilme, alterando a distribuição das espécies mais isoladas na contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), com biofilmes menos densos quando comparado ao controle, sugerindo que a utilização enzimática podem permitir a degradação da matriz extracelular exopolimérica e, assim, viabilizar o acesso de antimicrobianos às camadas mais profundas do biofilme, auxiliando na quantificação, *in vitro*, e compreensão proteica da matriz dos biofilmes (KARYGIANNI; ATTIN; THURNHEER,

2020). Entretanto, há uma carência de estudos clínicos que corroborem para segurança da utilização *in vivo* da proteinase K quando utilizada em menores concentrações, diante da toxicidade que essa enzima pode apresentar quando utilizada na concentração de 100%. Além disso, até onde se conhece, não há estudos sobre os efeitos dessa enzima sobre os agentes etiológicos da dermatofitose, bem como sua interação com antifúngicos.

### **3 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE/EFEITO SOBRE FUNGOS/DERMATÓFITOS**

Os fungos representam mais de 1,5 milhões de espécies, dentre tal representativo, cerca de 300 espécies são conhecidas por causar infecções em humanos (HAWKSWORTH, 2001). Assim, diante desse quantitativo patogênico, aliado ao progressivo aumento dos relatos de resistência, é necessário o acompanhamento desses casos e intervenções de controle da infecção (KONDORI et al., 2011; KONTOYIANNIS, 2017).

A descoberta de agentes antimicrobianos, bem como a melhoria no saneamento básico contribuíram na diminuição do panorama do início do XIX, onde a maior causa de morte era devido às doenças infecciosas (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI 2008). Todavia, houve um aumento de infecções fúngicas sistêmicas graves principalmente por causa do aumento nos casos de pacientes com sistema imunológico comprometido (GARBER, 2001).

As infecções fúngicas oportunistas são comuns entre os pacientes que tem a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou que passaram por procedimentos que suprimem o sistema imunológico, como transplante de órgão e quimioterapia (RICHARDSON, 2005; SINGH, PERFECT, 2007), tornando uma das principais causas de mortalidade ou uma causa de redução da qualidade de vida (DE OLIVEIRA; ATOBE; SOUZA; SANTOS, 2014).

Desse modo, é necessário ter antifúngicos disponíveis para o controle eficiente das infecções fúngicas, haja vista o número limitado de antifúngicos disponíveis à evolução da resistência aos antimicrobianos é um processo inevitável (REVIE; IYER; ROBBINS; COWEN, 2018). Uma das principais estratégias para melhorar a terapia das micoses é a superação da resistência antifúngica, por meio de descoberta de novos alvos (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

Assim, a padronização do teste de sensibilidade surge diante da necessidade de criação de métodos de avaliação de novas drogas, escolha da terapêutica antifúngica adequada, detecção e acompanhamento de isolados com resistência antifúngica (BORMAN et al., 2017). Dentre as técnicas para análise da atividade de agentes antifúngicos estão a discodifusão, a

diluição em ágar e a microdiluição em caldo, sendo esta técnica considerada padrão-ouro e referência para avaliação *in vitro* da sensibilidade à antimicrobiano (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; SCHUMACHER, 2018).

Rex e Pfaller propuseram a regra 90-60, afirmando que as infecções causadas por micro-organismos com CIMs considerados sensíveis respondem à terapia apropriada em aproximadamente 90% dos casos, enquanto as infecções causadas por isolados com CIMs considerados resistentes respondem de forma favorável à aproximadamente 60% dos casos (REX; PFALLER, 2002).

As organizações *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) e *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) normalizam os métodos de padronização para a realização desses testes de sensibilidade aos antifúngicos (KASSIM et al., 2016). Apesar de diferenças entre estes dois métodos, os seus resultados demonstraram ser comparáveis e são mundialmente utilizados (MCADAM, 2019).

CLSI normatizou metodologias de microdiluição de caldo para o teste de sensibilidade de fungos filamentosos, todavia diante da diversidade de patógenos fúngicos e o número de agentes antifúngicos disponíveis, o teste de sensibilidade antifúngica *in vitro* só foram propostos para um número limitado de espécies de fungo (JOHNSON; CAVLING-ARENDRUP, 2015).

Em 2017, foi publicada a terceira edição deste documento (M38, 3rd ed), destinada a fungos filamentosos capazes de causar infecções fúngicas cutânea e invasivas. Atualmente, o método inclui dermatófitos (*Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. e *Epidermophyton* spp.), *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp e outros Mucorales, *Lomentospora prolificans*, a forma filamentosa das espécies incluídas no complexo *S. schenckii* e fungos demáceos (CLSI, 2017).

Esses documentos estabelecem critérios para a realização dos testes, como preparo do inóculo, diluições das drogas, leitura, formulação do meio de cultura, temperatura de incubação, determinação da concentração inibitória mínima (CIM), voltados para células planctônicas (CLSI, 2017). Todavia, foi demonstrado a capacidade de formação do biofilme de dermatófitos, um dos fatores de virulência que corrobora na resistência do micro-organismo contra antifúngicos e sistema imunológico do hospedeiro (COSTA-ORLANDI et al., 2014; BRILHANTE et al., 2018). Logo, é essencial a avaliação dos biofilmes *in vitro* contra aos antifúngicos, enzimas e outras drogas (SCORZONI et al., 2017).

#### 4 HIPÓTESES

- Proteinase K tem efeito inibitório, *in vitro*, contra às espécies de dermatófitos na forma planctônica;
- Proteinase K causa redução nos biofilmes, *in vitro*, de dermatófitos;
- Proteinase K potencializa a ação dos antifúngicos em combinação com os antifúngicos, terbinafina e griseofulvina;
- Proteinase K isolada e combinada com terbinafina ou griseofulvina destrutura dos biofilmes de dermatófitos.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade da proteinase K, *in vitro*, em dermatófitos na forma planctônica e na matriz extracelular polimérica do biofilme, bem como investigar as interações dessa enzima com os antifúngicos, terbinafina e griseofulvina, frente aos biofilmes.

### 5.2 Objetivos específicos

- Avaliar a sensibilidade de células planctônicas de dermatófitos ante proteinase K;
- Avaliar a matriz extracelular polimérica de células sésseis de dermatófitos expostas à proteinase K;
- Analisar as associações entre proteinase K com os antifúngicos, terbinafina e griseofulvina, sobre os biofilmes de dermatófitos;
- Investigar a modificação na arquitetura dos biofilmes de dermatófitos ante proteinase K isolada e combinada com os antifúngicos, terbinafina e griseofulvina.

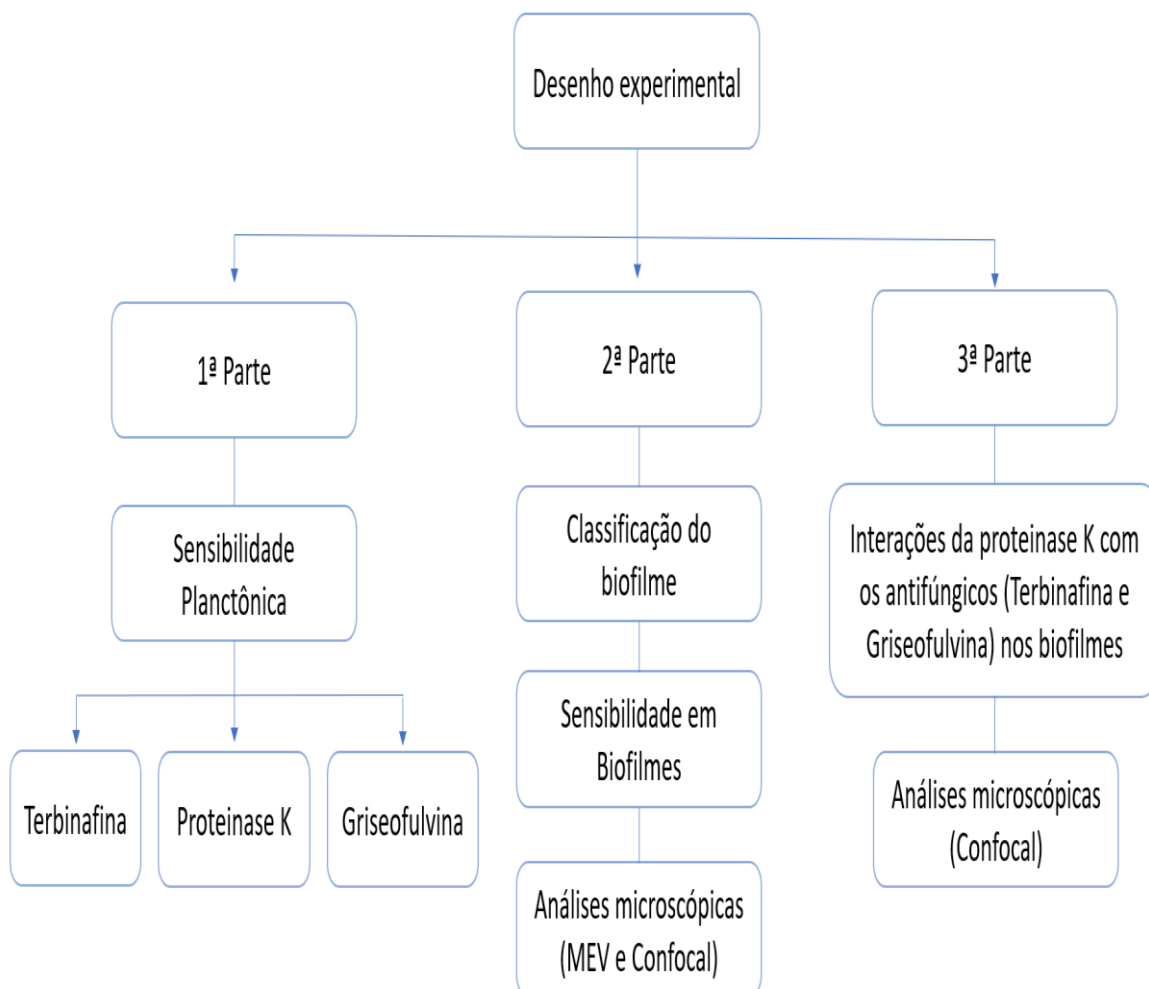


## 6 METODOLOGIA

### 6.1 Desenho do experimento

Este trabalho foi organizado em três etapas conforme Figura 16. 1) Sensibilidade planctônica dos dermatófitos ante terbinafina, proteinase K e griseofulvina; 2) Classificação do biofilme, sensibilidade do biofilme por meio da avaliação da atividade metabólica e da biomassa dos dermatófitos, e análise microscópica por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal; 3) investigação das interações, pela técnica de *checkerboard*, da proteinase K com terbinafina ou griseofulvina e análise da microscopia confocal.

Figura 16- Fluxograma de execução dos experimentos.



## 6.2 Local do estudo

As análises foram realizadas no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Universidade Federal do Ceará (UFC), com colaboração da Central Analítica da UFC na obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser.

## 6.3 Micro-organismos

Nesse estudo foram utilizadas 14 cepas (Tabela 1), sendo 3 *M. canis*, 5 *T. tonsurans*, 4 *T. mentagrophytes*, 1 *T. rubrum*, e 1 *E. floccosum*. Os isolados foram obtidos da coleção de cultura do Centro Especializado de Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil. As cepas foram cultivadas em ágar batata dextrose (Difco-Dickinson, USA), incubadas a 28 °C durante 7 a 15 dias. Foram utilizadas as cepas *Candida krusei* ATCC 6258 e *T. mentagrophytes* CEMM-05-06-115 como controle no teste de sensibilidade a antifúngicos.

Tabela 1- Origem das espécies de dermatófitos utilizadas nos testes de sensibilidade.

Espécie	Código da Micoteca	Origem
<i>Microsporum canis</i>	CEMM-05-6-129	Humana (1)
	CEMM-05-6-131	
	CEMM-05-6-132	Animal (2)
<i>Trichophyton tonsurans</i>	CEMM-01-3-89	Humana (5)
	CEMM-01-3-90	
	CEMM-01-3-91	
	CEMM-01-3-92	
	ATCC 28942	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	CEMM-05-6-114	Animal (4)
	CEMM-05-6-115	
	CEMM-05-6-116	
	CEMM-05-6- 117	
<i>Trichophyton rubrum</i>	CEMM-01-6-112	Humana (1)
<i>Epidermophyton floccosum</i>	CEMM-01-3-96	Humana (1)

## 6.4 Drogas

A proteinase K (Sigma - St. Louis, USA) foi preparada em uma solução contendo 0,60 g de Tris(hidroximetil)-aminometano [ $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ], 0,015g de  $\text{CaCl}_2$ , 10 ml de água destilada e ajustado o pH a 7,5 (Sigma - St. Louis-USA), de acordo com as recomendações do fabricante, a uma concentração de 20000  $\mu\text{g/ml}$ . A terbinafina (TRB, Sigma, St Louis, MO, USA) e griseofulvina foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, St. Louis, EUA), de acordo com a recomendação do documento M38 3rd do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017) preparada na concentração de 1600  $\mu\text{g/ml}$  e 6400  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

## 6.5 Inóculo

Os inóculos foram preparados de acordo com Costa-Orlandi et al. (2014), as colônias foram cultivadas por sete dias em ágar batata dextrose (Difco-Dickinson, EUA), a 28 °C, ou ágar aveia para *T. rubrum*, conforme recomendado pelo CLSI (2017). Posteriormente, as culturas foram cobertas com cerca de 5 ml de solução salina a 0,9% estéril, depois a superfície das colônias foi friccionada com *swabs* estéreis. A solução resultante foi transferida para outro tubo estéril e deixada para decantar por 5 min para sedimentação das hifas. Então, a suspensão de conídios foi transferida para um novo tubo estéril. A turvação foi então ajustada para 0,5 na escala de McFarland, contendo 2 a  $6 \times 10^6$  UFC/ml, e os conídios foram contados em câmara de Neubauer. Posteriormente, o inóculo foi diluído com solução salina a 0,9% estéril a uma concentração de concentração final de  $1 \times 10^3$  UFC /ml para teste em planctônico e  $1 \times 10^6$  UFC/ml para a formação de biofilme *in vitro*.

## 6.6 Teste de sensibilidade antifúngica planctônica

Os testes de sensibilidade foram realizados em microplacas de 96 poços, utilizando a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento M38 3rd do CLSI (CLSI, 2017), com adaptações. As concentrações das drogas variaram de 1,9 a 250  $\mu\text{g/ml}$  para proteinase K (PK), de 0,48 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$  para terbinafina (TRB) e griseofulvina (GRV). Os inóculos foram preparados como descrito acima e diluídos em RPMI 1640 para obter a concentração final de  $1 \times 10^3$  UFC /ml. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 96 h. Os valores da CIM foram determinados visualmente e definidos como o menor antifúngico

concentração capaz de causar uma redução de 80% no crescimento de fungos, quando comparado ao controle de crescimento sem drogas. As cepas *Candida krusei* ATCC 6258 e *T. mentagrophytes* CEMM-05-06-115 foram incluídas como controle. Os experimentos foram realizados em duplicatas (CLSI 2017).

### **6.7 Formação *in vitro* de biofilme**

A formação dos biofilmes foi realizada conforme o método descrito por Costa-Orlandi et al. (2014), com modificações. Os inóculos foram preparados conforme descritos anteriormente. Foram distribuídos 200 µl de inóculo em placas de 96 poços de fundo chato (Kartel, Switzerland). Após 3 h de adesão, os poços foram lavados com 200 µl de solução salina estéril e foram adicionados 200 µl de RPMI 1640 (Sigma - St Louis, USA). Em seguida, a placa foi incubada a 37 °C, durante 72 h para a formação do biofilme. Para cada cepa o experimento foi realizado em duplicata. Depois, a biomassa do biofilme foi quantificada por ensaio em cristal violeta e as densidades ópticas (DO) foram lidas em um espectrofotômetro (Biotek®) a 540 nm, conforme descrito por Cordeiro et al (2014). As cepas foram classificadas como fracas, moderadas e fortes produtoras de biofilme, de acordo com a quantidade de biomassa. Densidade óptica (OD) de poços livres de fungos, contendo apenas RPMI, foram utilizados como controle negativo. Os experimentos foram realizados em duplicata.

### **6.8 Teste de sensibilidade dos biofilmes**

Depois de formados, os biofilmes foram lavados com solução salina (NaCl 0,9%) e alíquotas de 200 µL de meio RPMI 1640 contendo cada droga foram adicionadas as microplacas que foram então incubadas a 37 °C por 96 h. As concentrações das drogas testadas variaram de 4 a 32 µg/ml para proteinase K e de 4 a 128 µg/ml para terbinafina e griseofulvina. Após exposição, o efeito das drogas foi avaliado pela quantificação da atividade metabólica, utilizando o ensaio de redução do 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma Chemical Corporation, EUA), como descrito por Kamiloglu et al. (2020), e a biomassa do biofilme foi quantificada pelo ensaio de coloração com violeta de cristal (Brilhante et al. 2017). Para tanto, alíquotas de 100 µL da solução MTT [1 mg/ml] dissolvido em phosphate-buffered saline (PBS) estéril e filtrada em membrana de 0,22 µM, foram adicionadas aos poços e as placas foram incubadas no escuro por 4 h a 37 °C. Após o período

de incubação, foi retirada a solução de MTT dos poços, adicionados 100 µl de DMSO nos poços tratados com MTT para solubilização do produto formado e a placa foi incubada por 30 min no escuro. Posteriormente, a solução foi transferida para uma nova placa para a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

### 6.9 Interações da proteinase K com antifúngicos em biofilmes de dermatófitos

A microdiluição em tabuleiro de xadrez foi realizada para avaliar as interações entre a proteinase K e os antifúngicos (griseofulvina e terbinafina) contra biofilmes maduros de dermatófitos (dois *M. canis* e dois *T. tonsurans*), conforme descrito por Brilhante et al. 2018. As espécies foram escolhidas, devido *M. canis* ser a mais isolada em animais e *T. tonsurans* pela sua prevalência nos humanos nos casos de *Tinea capitis*.

Os biofilmes foram formados conforme descrito anteriormente. Após o período de maturação, os biofilmes foram expostos às concentrações combinadas de proteinase K (8 - 32 µg/ml) com griseofulvina (1 - 256 µg/ml) ou terbinafina (1 - 256 µg/ml) e as placas foram incubadas a 37 °C por 96 h. A análise de viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de redução de MTT, e os dados foram analisados quanto a sinergismo, antagonismo e indiferença usando o modelo de aditividade Loewe, o qual a combinação da enzima com os antifúngicos é determinada pela seguinte fórmula:

$$\frac{d_1}{D_{y1}} + \frac{d_2}{D_{y2}} \begin{cases} =1 \text{ Aditividade} \\ <1 \text{ Sinergismo} \\ >1 \text{ Antagonismo} \end{cases}$$

Onde  $d_1$ ,  $d_2$  são as doses de droga 1 e droga 2 combinadas que produzem um efeito chamado de  $y$ , enquanto  $D_{y1}$  e  $D_{y2}$  são as doses da droga 1 e da droga 2 que produzem o mesmo efeito  $y$  quando administrada sozinha. O resultado dessa expressão matemática também é chamado de índice de interação na dose de combinação. Se o índice de interação for igual a 1 é classificada como aditiva, menor do que 1 é sinérgica e maior do que 1 é antagônico (LEDERER; DIJKSTRA; HESKES, 2019). A partir dos dados experimentais expressos como porcentagem de crescimento para cada poço da microplaca, a curva de resposta à dose de cada fármaco isolado é ajustada a uma equação de Hill. A superfície de resposta experimental é então comparada com a superfície de resposta modelada para calcular a distribuição de sinergia. Para visualização, os níveis de sinergia foram mapeados na superfície de resposta à dose de combinação experimental. Todos os Parâmetros foram avaliados foram realizados com o software CombeneFit (DI VEROLI et al. 2016).

## 6.10 Análises microscópicas dos biofilmes *in vitro* de dermatófitos

Uma cepa de cada espécie (*T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, e *E. floccosum*) foi utilizada para formação do biofilme sobre Thermanox® (Thermo Fisher Scientific - New York City - NY). Os biofilmes foram formados conforme descrição anterior, e os efeitos na estrutura dos biofilmes quando tratados com proteinase K (32 µg/ml) isolada e associada com os antifúngicos, terbinafina (128 µg/ml) e griseofulvina (128 µg/ml), foram avaliados por microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura.

Para a análise por microscopia confocal de varredura a laser, os biofilmes foram cultivados nos modelos *in vitro*, tratadas com proteinase K, e combinados a terbinafina ou griseofulvina em lamínulas Thermanox® de 13 mm (Thermo Fisher Scientific, NY, EUA) em placas de 12 poços estéreis. Após 96 h do biofilme com a droga a 37 °C, as soluções de corante fluorescente Live/Dead (Invitrogen 151MA), contendo SYTO9 e iodeto de propídio, e SYTO9 e concanavalin A, foram adicionados, de acordo com as instruções do fabricante, e lamínulas Thermanox® foram avaliadas com microscópio confocal Nikon C2. As imagens foram adquiridas com a câmera Nikon Eclipse Ti e processado com o software NIS elements AR, em 488 nm, para a detecção de SYTO9, que identifica células vivas, em 561 nm, para o detecção de iodeto de propídio, que identifica células mortas ou danificadas, e em 543 nm, para detecção da concanavalin A, que identifica glicoproteínas e glicolipídeos (KRAWCZYK et al. 2017; BRILHANTE et al. 2018; WU et al. 2021).

Para a análise por microscopia eletrônica de varredura, os biofilmes foram formados como descrito anteriormente sobre lâminas Thermanox® contendo droga no biofilme e processados de acordo Brilhante et al. (2018), com modificações. Posteriormente, os biofilmes foram cobertos com 2,5% glutaraldeído (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) em tampão cacodilato 0,15 M (Electron Microscopy Sciences, Hatfield) com azul de alcian 0,15% (Sigma Aldrich, St Louis, USA), pH 7,2 e incubado a 4 °C durante a noite. Após este período, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato (0,15 M) e as lamínulas foram desidratadas em série ascendente de álcool (50%, 70%, 80%, 95% e 100% de etanol) por 10 min para cada concentração. As lamínulas foram deixadas em temperatura ambiente e cobertas por hexametildisilazano (HMDS) durante 30 min. Posteriormente, o HMDS foi removido e as lamínulas foram deixadas para secar durante à noite, para serem cobertas com uma camada de ouro (Emitech Q150T) (10 nm), e observadas em microscópio de varredura Quanta FEG 450, em modo alto vácuo a 20 kV. As imagens foram processadas com Photoshop Software (Adobe Systems, San Jose, Califórnia) (BRILHANTE et al., 2018).

## 6.11 Análise Estatística

Para a análise dos resultados de sensibilidade planctônica das espécies de dermatófitos foi utilizada a variável concentração inibitória mínima (MIC50%) das espécies de cada droga, sendo considerado o número de diluições. Para os dados que apresentaram simetria e variâncias semelhantes, foi utilizado o teste t de Student e para os dados assimétricos foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. Na comparação entre espécies foi utilizado o Teste de Mann-Whitney. Para a comparação dos dados de absorbância onde foram verificadas simetria e variâncias semelhantes, foram utilizados os testes paramétricos e T de Student (2 grupos de dados) e ANOVA seguida do teste post hoc de Tukey para a análise de dados pareados (3 ou mais grupos de dados). Para os grupos de dados de absorbância onde foram verificadas assimetria e/ou elevada dispersão foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney (2 grupos de dados não pareados) e Friedman (3 ou mais grupos de dados pareados). Em todas as situações, o nível de significância máximo, adotado para conclusões afirmativas, foi de 5%. As análises estatísticas das interações foram realizadas com o software Combeneft, com base no modelo de Loewe. Em todas as situações, o nível de significância máximo, adotado para conclusões afirmativas, foi de 5%.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Sensibilidade planctônica nos dermatófitos

A proteinase K não apresentou atividade inibitória contra as células planctônicas de dermatófitos mesmo na concentração mais alta com 250 µg/ml (Tabela 2). Os valores de CIM da terbinafina variaram para *M. canis* de 0,015 - 0,25 µg/ml, para *T. tonsurans* de 0,0078 - 0,015 µg/ml e para *T. mentagrophytes* de 0,0078 - 0,25 µg/ml. Com relação ao *T. rubrum*, a CIM foi de 0,015 µg/ml e para *E. floccosum* foi de 0,0078 µg/ml.

Os valores de CIM da griseofulvina variaram para *M. canis* de 0,125 - 0,25 µg/ml, para *T. tonsurans* de 0,25 - 0,5 µg/ml e para *T. mentagrophytes* de 0,125 - 0,5 µg/ml. Com relação ao *T. rubrum* a CIM foi de 0,125 µg/ml e para *E. floccosum* foi de 0,25 µg/ml.



Tabela 2- Concentração inibitória mínima da terbinafina, griseofulvina e proteinase K em espécies de dermatófitos na forma planctônica.

Espécies	Antifúngicos		Enzima
	Terbinafina CIM (ug/ml)	Griseofulvina CIM (ug/ml)	Proteinase K CIM (ug/ml)
<i>Microsporium canis</i> (n=3)	0,015 (1) * 0,25 (2)	0,125 (2) 0,25 (1)	>250 (3)
<i>Trichophyton tonsurans</i> (n=5)	0,0078 (3) 0,015 (2)	0,25 (3) 0,5 (2)	>250 (5)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (n=4)	0,0078 (3) 0,25 (1)	0,125 (2) 0,5 (2)	>250 (4)
<i>Trichophyton rubrum</i> (n=1)	0,015 (1)	0,125 (1)	>250 (1)
<i>Epidermophyton floccosum</i> (n=1)	0,0078 (1)	0,25 (1)	>250 (1)

\*Números em parênteses representam a quantidade de cepas inibidas por esta concentração do fármaco. CIM: Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ).

## 7.2 Sensibilidade em biofilmes maduros de dermatófitos

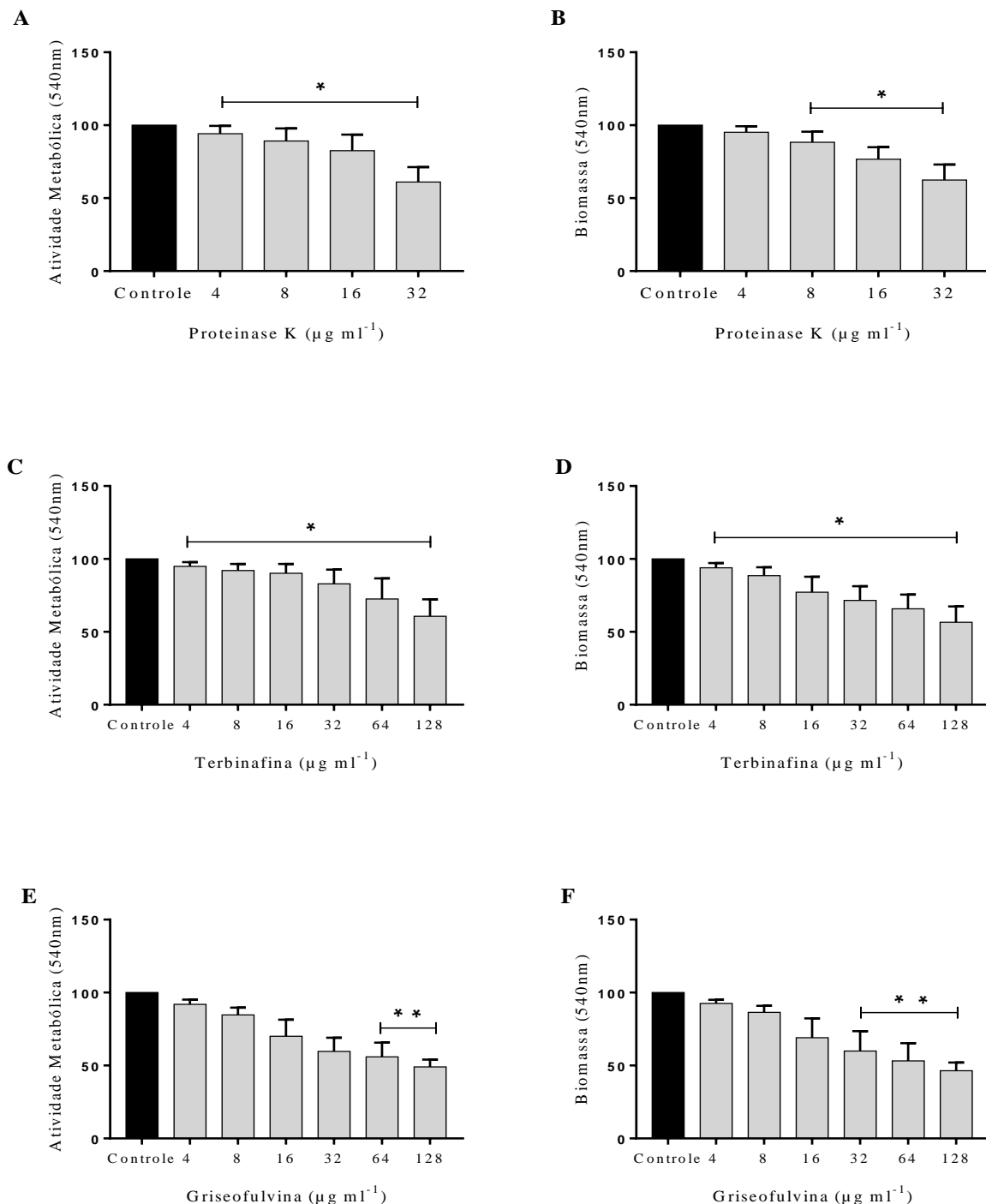
O ensaio de sensibilidade dos biofilmes maduros de dermatófitos mostraram reduções significativas quando expostos à proteinase K em todas as concentrações testadas em relação ao controle de crescimento do biofilme ( $P < 0,0001$ ). Nos biofilmes maduros expostos à 32  $\mu\text{g/ml}$  de proteinase K, causaram redução de 39% na atividade metabólica (Figura 17A) e 37,62% de biomassa (Figura 17B), respectivamente.

Os biofilmes maduros expostos à terbinafina quando comparado ao controle de crescimento do biofilme ( $P < 0,0001$ ), causaram reduções de 17,1% (32  $\mu\text{g/ml}$ ) na atividade metabólica (Figura 17C) e 25,5% na biomassa (Figura 17D), respectivamente. Enquanto, nas maiores concentrações testadas (128  $\mu\text{g/ml}$ ) causaram redução no biofilme de 39,9% na atividade metabólica e 43,5% na biomassa.

Quando os biofilmes maduros foram expostos à griseofulvina, em relação ao controle de crescimento do biofilme, causaram reduções de 40,4% (32  $\mu\text{g/ml}$ ) na atividade metabólica (Figura 17E) e 40% na biomassa (Figura 17F), respectivamente. Enquanto, nas maiores concentrações testadas (128  $\mu\text{g/ml}$ ) causaram redução no biofilme de 51% na atividade metabólica e 53,6% na biomassa ( $P < 0,001$ ).

Além disso, a proteinase K na concentração de 32  $\mu\text{g/ml}$  causou maior redução nos biofilmes maduros do que a terbinafina ( $P < 0,0001$ ), e os valores foram próximos na redução da atividade metabólica e da biomassa em comparação com griseofulvina ( $P < 0,001$ ).

Figura 17- Sensibilidade *in vitro* de biofilmes de dermatófitos maduros exposto à proteinase K, terbinafina e griseofulvina.



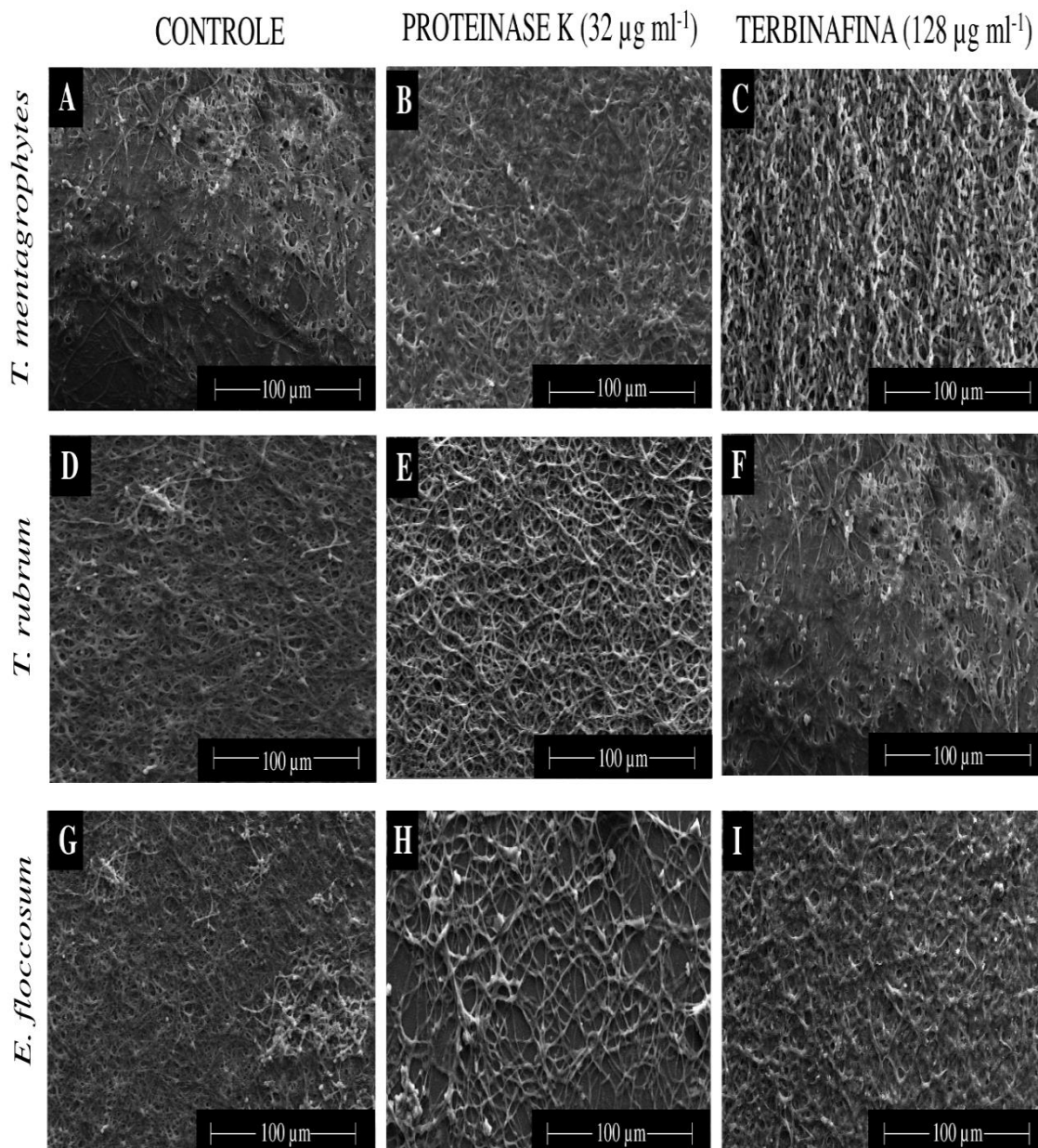
Legenda: Sensibilidade *in vitro* de biofilmes de dermatófitos maduros à proteinase K (A e B), terbinafina (C e D) e griseofulvina (E e F). Dados apresentados em porcentagem (%) das médias dos parâmetros de crescimento do biofilme após a exposição às drogas (barras cinzas) em comparação com o controle de crescimento do biofilme sem drogas (barras pretas). C: controle. Atividade metabólica (MTT): leitura a 540 nm. Biomassa (CV): leitura a 540 nm. MIC: concentração inibitória mínima. \* ( $P < 0,0001$ ) e \*\* ( $P < 0,001$ ) representam diferenças significativas em comparação com o controle de crescimento de biofilme livre de drogas (controle).

### 7.3 Microscopia dos biofilmes maduros de dermatófitos tratados com proteinase K

Foram observados nos biofilmes maduros expostos à proteinase K (32 µg/ml) e terbinafina (128 µg/ml) alterações na estrutura e na morfologia. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram estruturas filamentosas envoltas por uma matriz extracelular polimérica, com canais de água bem estruturados nos biofilmes quando não foram expostos à enzima e ao fármaco (Figura 18). Os biofilmes de *T. mentagrophytes* (Figura 18), de *T. rubrum* (Figura 18 E) e de *E. floccosum* (Figura 18 H) mostraram uma redução no material extracelular ( $P < 0,0001$ ) quando tratados com 32 µg/ml de proteinase K. Os biofilmes de *T. mentagrophytes* (Figura 18 C), *T. rubrum* (Figura 18 F) e *E. floccosum* (Figura 18 I), após tratamento com 128 µg/ml de terbinafina, tiveram perda de organização estrutural e redução no número de células em comparação com o controle não tratado ( $P < 0,0001$ ).

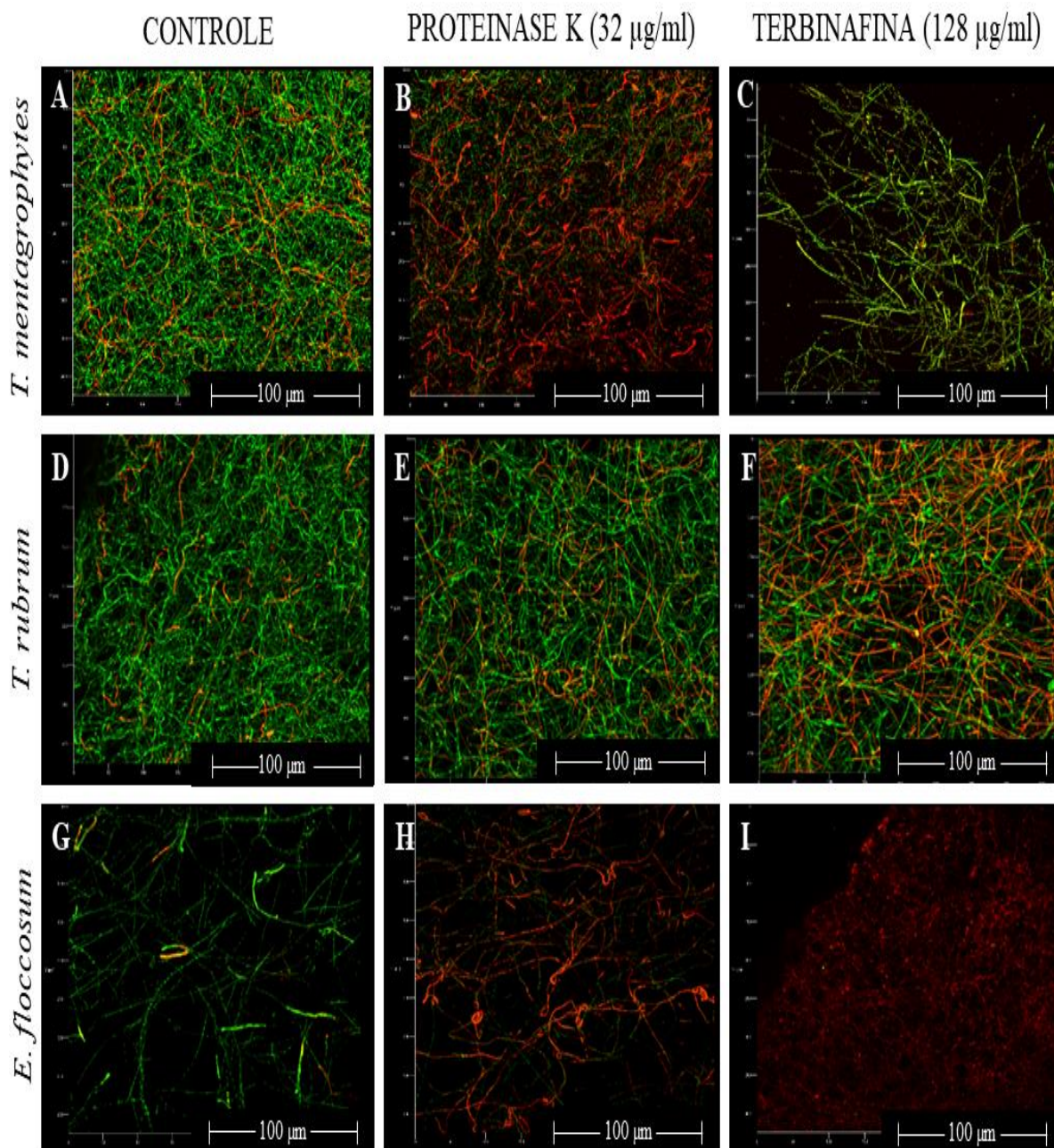
Na análise microscópica confocal a laser, revelou-se uma redução de células viáveis dos biofilmes maduros de *T. mentagrophytes* (Figura 19 B), *T. rubrum* (Figura 19 E) e *E. floccosum* (Figura 19 H) tratados com proteinase K (32 µg/ml), e nos biofilmes maduros de *T. mentagrophytes* (Figura 19 C), *T. rubrum* (Figura 19 F) e *E. floccosum* e tratado com terbinafina (128 µg/ml) em comparação com o controle sem droga (Figura 19 A, D e G).

Figura 18 - Microfotografia de biofilmes em microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de dermatófitos.



Legenda: Imagens de MEV são representativas da sensibilidade do biofilme de dermatófito *in vitro*. A, B e C: Biofilmes de *T. mentagrophytes*. (A) crescimento sem exposição à droga; (B) exposto a 32  $\mu\text{g/ml}$  de proteinase K; (C) exposto a 128  $\mu\text{g/ml}$  de terbinafina. D, E e F: Biofilmes de *T. rubrum*. (D) não exposto, controle de crescimento. (E) exposto a 32  $\mu\text{g/ml}$  de proteinase K; (F) exposto a 128  $\mu\text{g/ml}$  de terbinafina. G, H e I: Biofilmes de *E. floccosum*; (G) controle de crescimento não exposto, com presença de estruturas filamentosas incorporado em uma matriz polimérica extracelular rugosa e canais de água bem estruturados; (H) exposto a 32  $\mu\text{g/ml}$  de proteinase K; (I) exposto a 128  $\mu\text{g/ml}$  de terbinafina. Ampliações: X 1000 (A, D e G), X 2500 (E), X 3000 (B, C, F, H e I); e barras de escala de 100  $\mu\text{m}$ .

Figura 19 - Microfotografia de biofilmes em microscopia confocal a laser de biofilmes de dermatófitos.



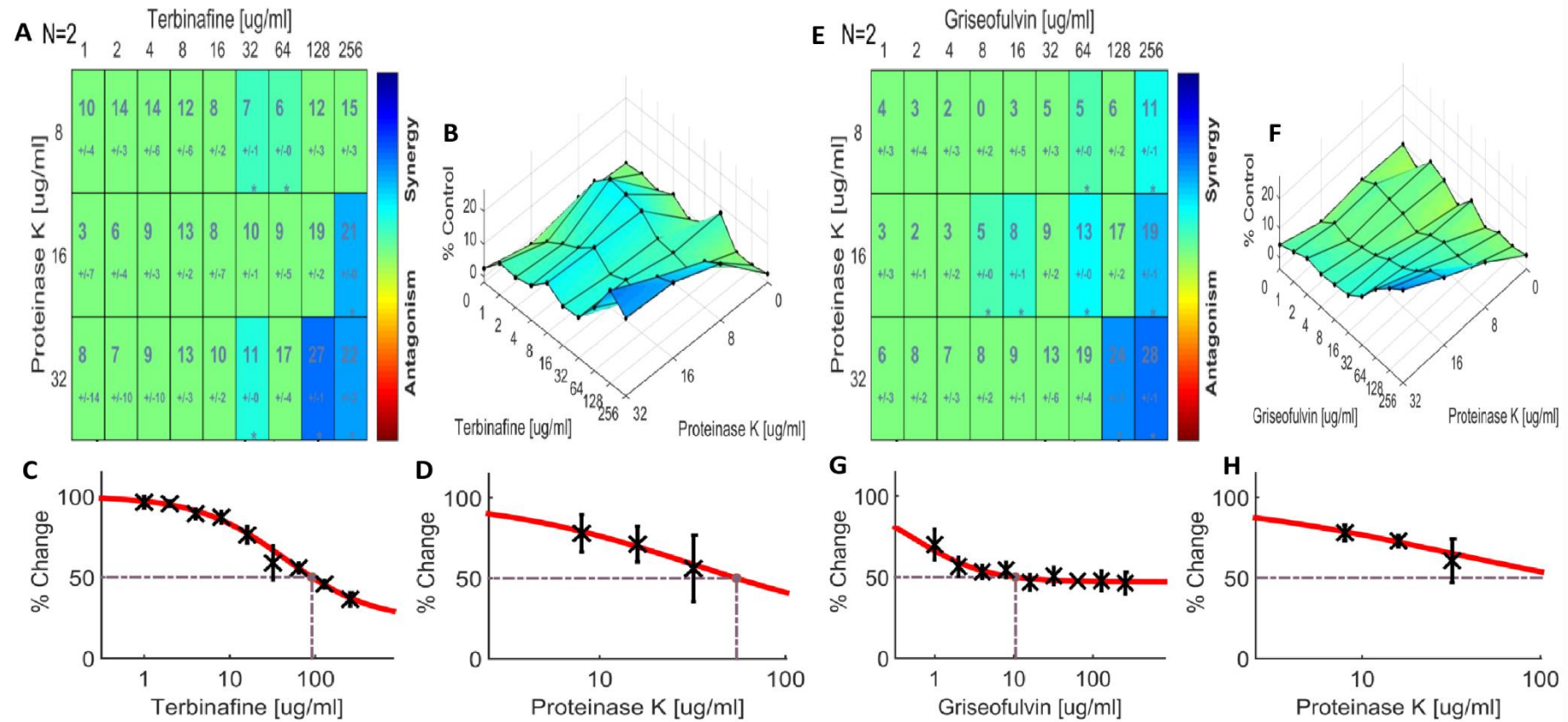
Legenda: Imagens de microscopia de confocal a laser representativas da suscetibilidade ao biofilme de dermatófitos *in vitro* A, B e C: Biofilmes de *T. mentagrophytes*. (A) crescimento sem exposição à droga; (B) exposto a 32  $\mu\text{g/ml}$  de proteinase K; (C) exposto a 128  $\mu\text{g/ml}$  de terbinafina. D, E e F: Biofilmes de *T. rubrum*. (D) não exposto, controle de crescimento. (E) exposto a 32  $\mu\text{g/ml}$  de proteinase K; (F) exposto a 128  $\mu\text{g/ml}$  de terbinafina. G, H e I: Biofilmes de *E. floccosum*; (G) controle de crescimento não exposto; (H) exposto a 32  $\mu\text{g/ml}$  de proteinase K; (I) exposto a 128  $\mu\text{g/ml}$  de terbinafina. Ampliações: 400. Lasers: 488 nm (SYTO 9) e 561 nm (iodeto de propídio) foram usados concomitantemente, demonstrando o crescimento dos fungos. Escala barras: 100  $\mu\text{m}$ .

#### 7.4 Interações da proteinase K com terbinafina ou griseofulvina

As combinações entre a proteinase K e os antifúngicos, terbinafina e griseofulvina, mostraram interações sinérgicas ( $P < 0,05$ ) contra biofilmes maduros de *M. canis* (Figura 20) e *T. tonsurans* (Figura 21), sendo de 32  $\mu\text{g/ml}$  (proteinase K) / 128-256  $\mu\text{g/ml}$  (terbinafina ou griseofulvina) para *M. canis* (Figura 20 A e E); 8-32  $\mu\text{g/ml}$  (proteinase K) / 128-256  $\mu\text{g/ml}$  (terbinafina) para *T. tonsurans* (Figura 21 A); e 32  $\mu\text{g/ml}$  (proteinase K) / 128-256  $\mu\text{g/ml}$  (griseofulvina) para *T. tonsurans* (Figura 21 E). A análise espectrofotométrica dos testes de sensibilidade em tabuleiro de xadrez é representada por mapas e gráficos analisados pelo Combeneft, demonstrando a interação sinérgica entre PK/TRB e PK/GRV (Figura 20 e 21). Por meio do software foi gerado o valor de efeito máximo (Figura 20C, 20 D, 20 G, 20 H, e 21 C, 21 D, 21 G e 21 H) estipulado capaz de causar redução da metade do controle ( $EC_{50}$ ).



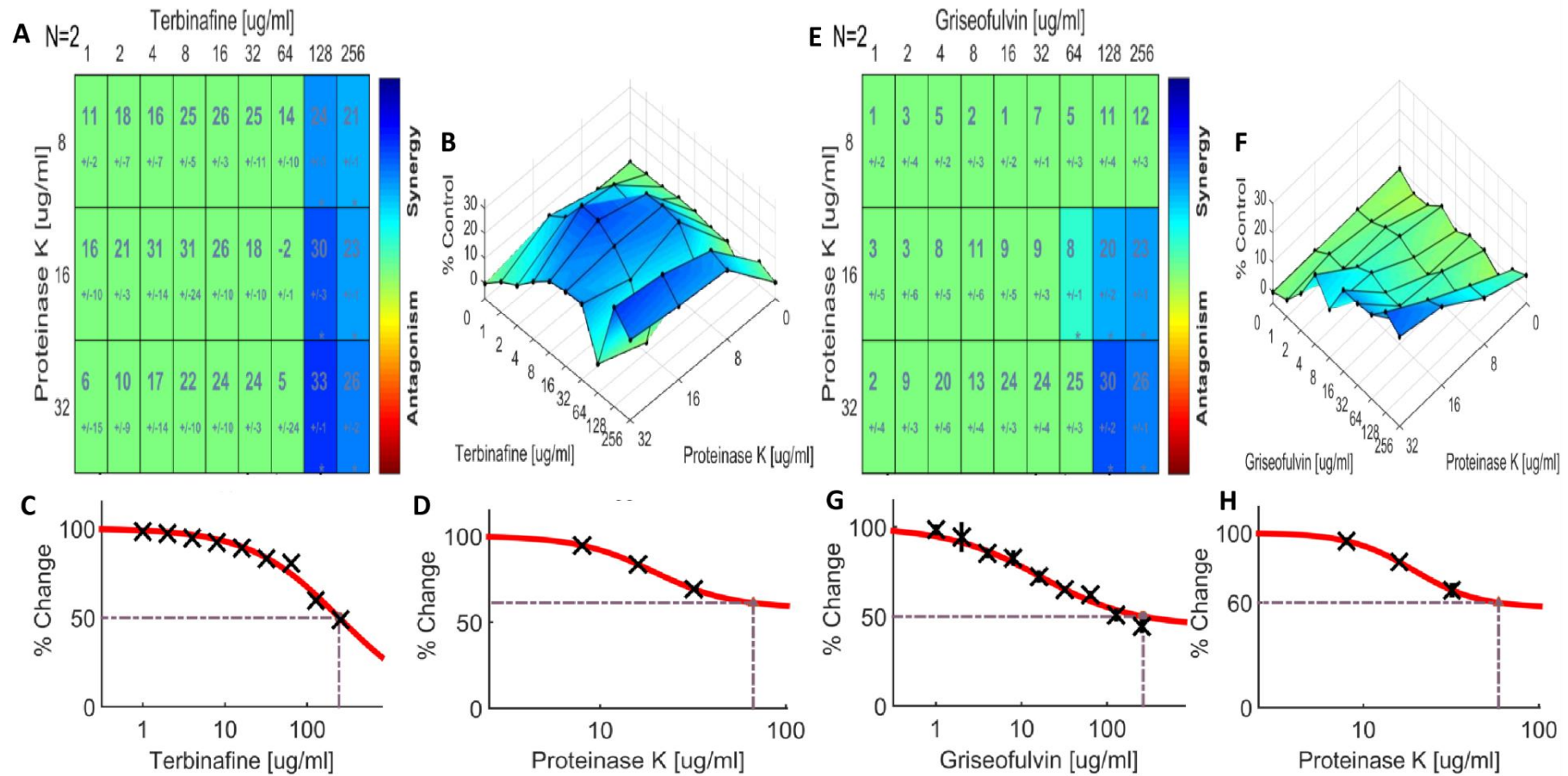
Figura 20 - Mapa das interações entre proteinase K e terbinafina ou griseofulvina em biofilme de *Microsporium canis*.



Legenda: Interações da proteinase K e terbinafina (A e B), proteinase K e griseofulvina (E e F) contra biofilmes de *M. canis* (A, B, C, D, E, F, G e H), analisados por modelo de superfície de resposta com base no modelo Loewe. Sinergia mapeada na superfície de resposta (A e E). Curvas de resposta à dose em biofilmes maduros de *M. canis* induzidos por proteinase K e antifúngicos (terbinafina e griseofulvina) isolados (C, D, G e H). Significância estatística: \*  $P < 0,05$ . As áreas verdes representam valores estatisticamente insignificantes.



Figura 21 - Mapa das interações entre proteinase K e terbinafina ou griseofulvina em biofilme de *Trichophyton tonsurans*.

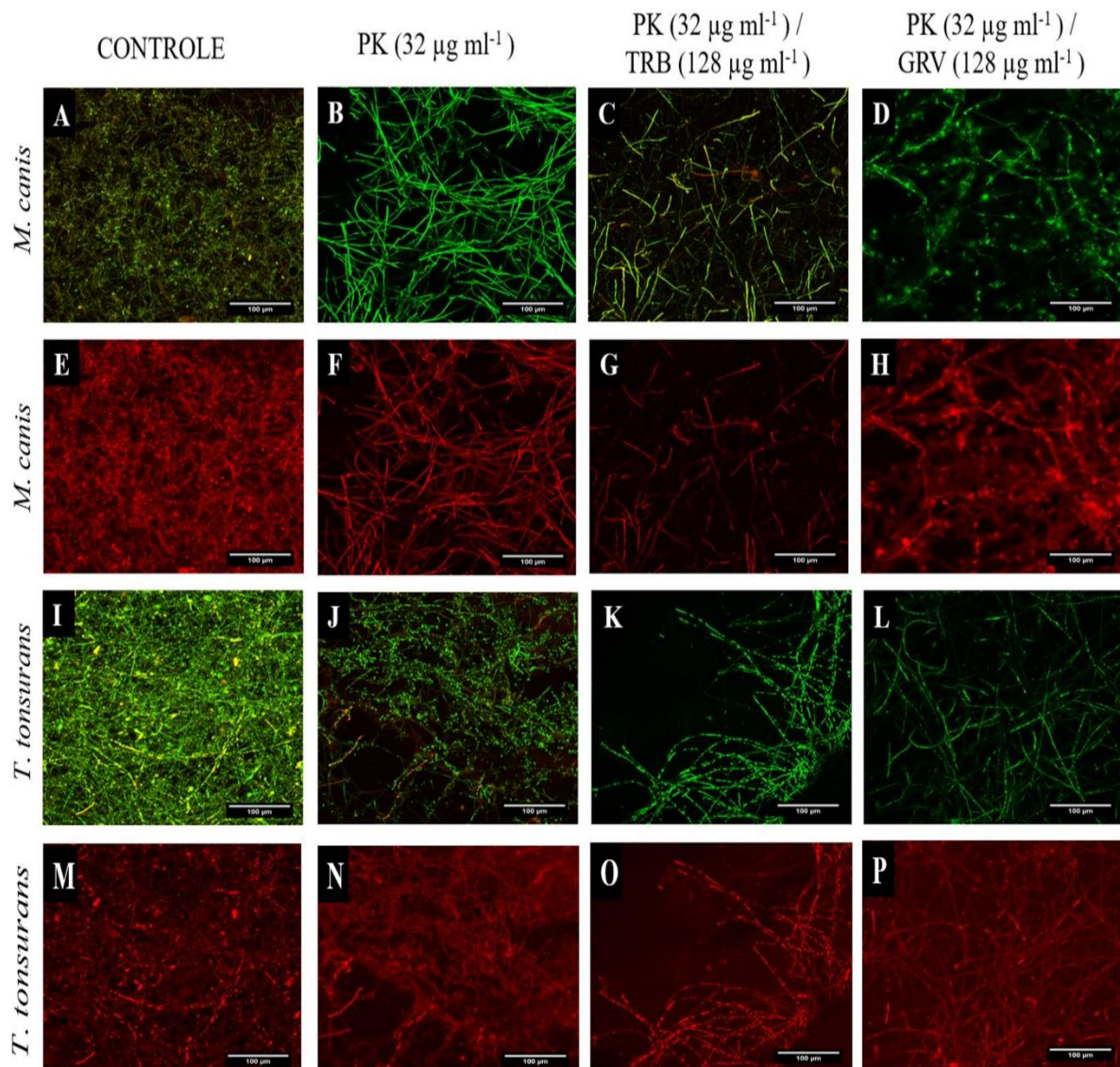


Legenda: Interações da proteinase K e terbinafina (A e B), proteinase K e griseofulvina (E e F) contra biofilmes de *T. tonsurans* (A, B, C, D, E, F, G e H), analisados por modelo de superfície de resposta com base no modelo Loewe. Sinergia mapeada na superfície de resposta (A e E). Curvas de resposta à dose em biofilmes maduros de *T. tonsurans* induzidos por proteinase K e antifúngicos (terbinafina e griseofulvina) isolados (C, D, G e H). Significância estatística: \*  $P < 0,05$ . As áreas verdes representam valores estatisticamente insignificantes.

### **7.5 Microscopia dos biofilmes maduros de dermatófitos tratados com proteinase K associados a terbinafina ou griseofulvina**

Foram observadas alterações na estrutura morfológica dos biofilmes quando expostos a proteinase K (32 µg/ml), proteinase K (32 µg/ml) / terbinafina (128 µg/ml) e proteinase K (32 µg/ml) / griseofulvina (128 µg/ml) ( $P < 0,05$ ). A análise da microscopia confocal revelou redução das hifas e da matriz extracelular polimérica dos biofilmes de *M. canis* e *T. tonsurans* após o tratamento com proteinase K (32 µg/ml), sendo demonstrados na Figura 22 B / 22 J e na Figura 22 F / 22 N, respectivamente. Os biofilmes formados por *M. canis* e *T. tonsurans* expostos à combinação de proteinase K-terbinafina (Figura 22 C, 22 G, 22 K e 22 O) e à combinação de proteinase K-griseofulvina (Figura 22 D, 22 H, 22 L e 22 P) tiveram maiores reduções metabólicas quando comparado aos controles dos biofilmes sem drogas (Figura 22 A / 22 E e Figura 22 I / 22 M).

Figura 22 - Microfotografia de biofilmes de dermatófitos tratados com proteinase K e terbinafina ou griseofulvina em microscopia confocal a laser.



Legenda: Imagens da microscopia confocal de varredura a laser representativas de testes de sensibilidade ao biofilme dermatófito *in vitro*. A, B, C, D, E, F, G e H: Biofilmes de crescimento de *M. canis*: (A) não expostos à droga com estruturas filamentosas; (E) crescimento da matriz extracelular polimérica não exposto à enzima ou antifúngicos; (B e F) exposto a 32 µg/ml de proteinase K; (C e G) expostos a 32 µg/ml de proteinase K / 128 µg/ml de terbinafina; (D e H) exposto a 32 µg/ml de proteinase K / 128 µg/ml de griseofulvina. I, J, K, L, M, N, O e P: Biofilmes de *T. tonsurans*. (I) controle de crescimento não exposto; estruturas filamentosas; (M) controle de crescimento não exposto; matriz polimérica extracelular pode ser observada; (J e N) expostos a 32 µg/ml de proteinase K; (K e O) exposto a 32 µg/ml de proteinase K / 128 µg/ml de terbinafina; (L e P) expostos a 32 µg/ml de proteinase K / 128 µg/ml de griseofulvina. Observa-se uma redução na quantidade de estruturas fúngicas em biofilmes *in vitro* para proteinase K, proteinase K / terbinafina e proteinase K / griseofulvina. Aumentos: 400. Lasers: 481 nm (SYTO 9) e 543 nm (Concanavalina A) foram usados concomitantemente, demonstrando o crescimento dos dermatófitos. Barras de escala: 100 µm.

## 8 DISCUSSÃO

Os casos de infecções dermatofíticas crônicas tornou-se um problema de saúde pública devido a resistências aos antifúngicos. O uso contínuo de terbinafina e griseofulvina, principais drogas utilizadas no tratamento, em pacientes com infecções recalcitrantes por dermatófitos podem levar ao surgimento de mutações, mesmo que sejam baixa frequência, e seleção dessas espécies responsáveis pela progressão dessa infecção (KHURANA; SARDANA; CHOWDHARY et al., 2019). Além disso, a falha desses agentes pode estar associada a dificuldade em atravessar a matriz extracelular polimérica do biofilme (AL-FATTANI, DOUGLAS, 2006). Assim, a utilização enzimática da proteinase K auxilia no entendimento da importância da proteína na matriz extracelular polimérica dos dermatófitos.

A proteinase K não apresentou efeito inibitório em células planctônicas dos dermatófitos, ainda que tenham sido utilizadas nas maiores concentrações (250 µg/ml). Apesar da membrana celular fúngica ter em sua composição glicoproteínas, talvez a enzima não tenha sido capaz de transpor a parede fúngica, a estrutura que entra em contato com o meio externo, que tem como constituintes quitina e glucanas (KARKOWSKA-KULETA et al., 2020). Esse comportamento da proteinase K também foi observado contra a forma planctônica de *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes*, porém o tratamento com proteinase K levou a um aumento da densidade das células planctônicas e somente no biofilme ocorre redução, sugerindo que proteinase K degrada as proteínas adesinas que se ligam a superfície e as proteínas constituintes fundamentais da matriz de extracelular polimérica (NGUYEN; BURROWS, 2014; ELADAWY et al., 2020).

Com relação a sensibilidade planctônica, os valores de CIM para terbinafina na forma planctônica de dermatófitos, foram observadas variações de 0,0078 - 0,25 µg/ml. Em estudos realizados por Brilhante et al. (2021) em cepas *Sporothrix* spp. na forma filamentosa as CIM variaram de 0,03 - 0,25 µg/ml, e Castello-Branco et al. (2020) demonstram em dermatófitos que as CIM variaram de 0,000097 - 0,25 µg/ml, sendo dados compatíveis com os dados obtidos neste estudo. Yamada et al. (2017) observaram em pacientes com *tinea pedis* ou *tinea unguium* que 17 isolados do gênero *Trichophyton* mostraram reduções na sensibilidade ao uso de terbinafina, com CIM >16,8 µg/ml, foram encontrados diferentes mutações no gene escaleno epoxidase (SQLE) que ocorreram substituições de aminoácidos únicos em uma das quatro posições (Leu 393, Phe397, Phe 415 e His 440) da proteína SQLE, também encontraram que as alterações de aminoácidos nos clones de *Arthroderma vanbreuseghemii* que abrigam

os genes AvSQLE e sSQLE foram 8 a 512 vezes menos sensíveis à terbinafina em comparação com a cepa parental.

Os valores de CIM da griseofulvina variaram de 0,125 - 0,5 µg/ml. Estudo realizado por Brilhante et al. (2017), observaram que os MIC em cepas de dermatófitos variam de <0,0039 a 4 µg/ml. Em 7 isolados de dermatófitos demonstraram CIM >32 µg/ml, podendo estar relacionado com altos níveis de transcrições nos genes de PDR1 e MDR2, transportadores de ATP, podendo estar relacionados ao efluxo de griseofulvina, outrossim, mesmo com a supressão de genes MDR2, foi observado que o gene suprimido, nos dermatófitos, pode transferir suas funções para outros genes, como MDR4, fazendo essa compensação diante a drogas antifúngicas, todavia, apesar desses genes apresentarem semelhanças, é provável que tenham funções específicas, sugerindo que a ação de cada fármaco é dependente também de outros fatores inerentes de cada espécie (MARTINS et al., 2016; LANA et al., 2018).

Nos biofilmes maduros de dermatófitos a proteinase K na concentração de 32 µg/ml causaram reduções de 37,62% na biomassa. Em biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus lugdunensis* a sensibilidade ao tratamento enzimático é dependente dos componentes que constituem a matriz do biofilme (CHAIGNON et al., 2007).

Além disto, conforme os dados dos gráficos, a partir do modelo de Loewe, da proteinase K isolada em biofilmes de *M. canis* e *T. tonsurans*, a curva tem demonstrado comportamento de uma parábola com concavidade voltada para baixo que se estabiliza em determinadas concentrações da enzima, sugerindo não ser possível que a proteinase K possa causar redução de 100% do biofilme. Shukla et al. (2013) observaram que em biofilmes de *Staphylococcus aureus* ocorreram reduções de 36% na biomassa quando tratado com 2 µg/ml de proteinase K, enquanto tratados em concentrações de 250 µg ml<sup>-1</sup> houve redução de 76% na biomassa do biofilme, evidenciando que o aumento da concentração de proteinase K não resultou em aumento proporcional da redução no biofilme e não foi encontrada uma concentração capaz de reduzir 100%, corroborando com os dados do presente estudo.

Outrossim, Shukla et al. (2017) observaram diminuição na proteína e no DNA extracelular (eDNA) na matriz extracelular polimérica, demonstrando que esses componentes são essenciais na estabilização do biofilme de *S. aureus*. Assim, a utilização enzimática da proteinase K, *in vitro*, como degradante de proteína é uma abordagem que pode ser usada para analisar a relevância desse componente nos biofilmes (KARYGIANNI; ATTIN; THURNHEER, 2020).

Observamos que terbinafina na concentração de 128  $\mu\text{g ml}^{-1}$  reduziu a atividade metabólica dos biofilmes dermatófitos em 39,9%. Lin et al. (2018) relataram que os biofilmes formados por *T. rubrum* e *M. canis* foram reduzidos em 50% quando tratados com concentrações de terbinafina a partir de 256  $\mu\text{g/ml}$ , além disso, concentrações de terbinafina 500 vezes maiores do que a CIM para células planctônicas foram necessárias para reduzir a atividade metabólica de biofilmes de dermatófitos maduros.

Embora a terbinafina esteja entre os medicamentos mais usados contra a dermatofitose (GUPTA et al. 2017), há alguns casos que não é eficaz, exigindo terapia combinada para superar a resistência, principalmente em casos crônicos e recorrentes (RENGASAMY et al. 2017; KAUR et al. 2020). Foram relatados pacientes com dermatofitose crônica que não respondem ao tratamento antifúngico, com valores de CIM antifúngico contra cepas isoladas que excedem o limite de sensibilidade, incluindo para terbinafina, o que pode estar relacionado à capacidade de formar biofilmes e mutações genéticas, como as alterações na enzima esqualeno epoxidase nos dermatófitos (GUPTA et al. 2018; VINEETHA et al. 2018; GU et al. 2020).

Nos biofilmes maduros de dermatófitos, a griseofulvina testada a concentração de 128  $\mu\text{g/ml}$  causaram redução no biofilme de 51% na atividade metabólica e 53,6% na biomassa. Hipotetiza-se que na onicomicose e nas *tineas* talvez seja possível ter o biofilme no leito ungueal e em pelos de animais, respectivamente, devido a comprovação em modelos *ex vivo* em fragmentos de unhas humanas e em pelos de gatos, o que pode corroborar na dificuldade do tratamento dessa dermatofitose e contribui nos casos refratários e crônicos (BRILHANTE et al. 2018; GUPTA et al., 2018; CASTELO-BRANCO et al., 2020). Na clínica, um estudo realizado por Singal et al. (2001), em 153 pacientes com *tinea capitis*, 97,4% tiveram cura com o tratamento com griseofulvina, com boa tolerância e sem apresentação dos efeitos adversos, apresentando a eficácia desse fármaco para infecções por dermatófitos, e de acordo com testes *in vitro*, 2 pacientes apresentaram isolados resistentes contra griseofulvina, sendo necessária a utilização do fluconazol para a melhora do quadro.

Desse modo, as alterações bioquímicas podem resultar na amplificação gênica, como a superexpressão de genes, com transferência gênica, além de deleção gênica, mutações pontuais, perda de elementos reguladores de ação cis e trans e ativação transcricional (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008; DOLENC-VOLJČ, 2016). Outrossim, a resistência antifúngica e a recorrência dessas dermatofitoses, como a onicomicose, em associação com a terapia prolongada e com altas doses, podem estar relacionadas a capacidade de formar biofilmes por esses organismos (GUPTA; DAIGLE; CARVIEL, 2016), sendo



primordial a busca de novas moléculas que atuem nos componentes da matriz que possam atuar como monoterapia, bem como potencializar a terapia antifúngica.

Assim, foram realizadas as associações de proteinase K (32 µg/ml) com terbinafina (128 µg/ml) ou griseofulvina (128 µg/ml), tendo apresentado efeito sinérgico. Em biofilme de *Helicobacter pylori*, a combinação de proteinase K (0,5 µg/ml) com claritromicina (12,03 mg/L) resultou maior redução no biofilme, aproximadamente redução de 75% na biomassa, quando comparado ao tratamento monoterapia com claritromicina, redução de 60% da biomassa, sugerindo que a matriz extracelular possa limitar a ação do antibiótico, e mesmo que a combinação não tenha ocasionado erradicação do biofilme, pode ter outros mecanismos que contribuam para a resistência, como a superexpressão de bombas de efluxo (HATHROUBI et al., 2020), todavia, é necessário a elucidação de tais mecanismos.

Com relação aos biofilmes de *S. aureus*, a combinação da proteinase K (2 µg/ml) com gentamicina (150 µg/ml), *in vitro*, apresentou efeito sinérgico, tendo maior redução associação da enzima com o antibiótico do que a utilização da gentamicina de forma isolada (SHUKLA et al., 2017). Em biofilmes multiespécies orais de *Candida* spp. e *Streptococcus* spp. quando tratados com DNase I e proteinase K foi observado biofilme de menor densidade ao ser comparados aos controles, com redução de eDNA e proteínas extracelulares, alteração na estrutura dos biofilmes, entretanto, isso favoreceu o crescimento de *Streptococcus* spp., provavelmente, devido a diminuição da competição nutricional entre os organismos do biofilme, demonstrando que a proteinase K em associação com antimicrobianos ou com enzimas pode auxiliar na redução dos biofilmes monoespécies e multiespécies (KARYGIANNI; ATTIN; THURNHEER, 2020).

Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que a proteinase K desfez a organização estrutural dos biofilmes de dermatófitos, com hifas mais espaçadas, sendo encontradas algumas células ainda aderidas na superfície da Thermanox®. Embora haja essas células aderidas à Thermanox®, na microscopia confocal a laser relevaram imagens de células mortas ou com dano de membrana.

Ademais, a imagens da enzima (proteinase K) combinada aos antifúngicos (terbinafina e griseofulvina) na microscopia confocal a laser revelaram redução da matriz, sendo principal alvo de estudo, devido a maneira de propiciar um ambiente tridimensional, semelhante a um gel, altamente hidratado por causa da presença dos canais de água que auxiliam nesse processo, nos quais os componentes da matriz podem retardar o acesso dos medicamentos a tal ponto que as células localizadas nas profundezas de uma microcolônia escapam da exposição, o que dificulta sua eliminação (FLEMMING, 2000).

Os componentes da matriz de biofilmes microbianos são compostos principalmente por exopolissacarídeos, e muitos são carregados negativamente devido à presença de grupos carboxila, sulfato ou fosfato, com presença de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (KOO et al., 2017). Alguns desse componentes estão relacionados a virulência microbiana, como ácido manurônico com ácido gulurônico e *N*- acetilglucosamina ligada a poli  $\beta$  -1,6. Em biofilmes mistos de *Staphylococcus aureus* e *C. albicans*, a matriz do fungo secreta  $\beta$ -1,3 glucano, conferindo a bactéria resistência aos antibióticos (KONG et al., 2016)

Por meio das microscopias eletrônica e confocal foi possível visualizar diferentes reduções entre as espécies de dermatófitos quando tratados com proteinase K (32  $\mu$ g/ml). A composição da matriz é dinâmica e varia de acordo com micro-organismos, e pode ser afetada pelo meio externo, assim, alterações nas condições de crescimento, como temperatura, pH, podem levar a alterações dos constituintes (FLEMMING et al., 2016). Mediante as avaliações da composição da matriz dos biofilmes de *Candida albicans* foram observados a presença de polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (MITCHELL et al., 2016).

A partir dos avanços das técnicas de proteômica, glicômica e lipidômica vêm sendo analisados, identificados e catalogados os bipolímeros presente na matriz, sendo demonstrado que na matriz extracelular polimérica em biofilme de *C. albicans* as proteínas representam cerca de 55% do peso, sendo maior representação do que os carboidratos, e dentre a análise das proteínas e glicoproteínas, extraídas da matriz do biofilme, foram identificadas 565 proteínas diferentes, algumas delas havia semelhança notável entre os componentes proteicos presentes nos sobrenadantes do fungo na forma planctônica, sugerindo que o material da forma livre acabava compondo parte da matriz durante a formação do biofilme (THOMAS; BACHMANN; LOPEZ-RIBOT, 2006; ZARNOWSKI et al., 2014). Todavia, ainda precisa de mais estudos para quantificar e elucidar os componentes da matriz dos dermatófitos.



## 9 CONCLUSÃO

Diante da importância da proteinase K em biofilmes, este estudo mostrou que a proteinase K possui capacidade de reduzir os biofilmes maduros de dermatófitos. Ademais, a proteinase K em combinação com drogas antifúngicas, terbinafina e griseofulvina, mostraram efeito sinérgico contra biofilmes maduros de dermatófitos, sendo observados desestruturação e células danificadas através da microscopia eletrônica de varredura e confocal a laser. Nesse contexto, os dados *in vitro* de ação da proteinase K e da interação sinérgica da enzima com os antifúngicos contra biofilme de dermatófitos trazem informações necessárias para perspectivas futuras da relevância das proteínas na matriz extracelular polimérica dos biofilmes de dermatófitos, por meio da disponibilização de informações fundamentais para abordagem de testes *in vivo* e de mais estudos para elucidar as análises farmacológicas da proteinase K.

## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, N.; GOINDI, S. Preparation and evaluation of antifungal efficacy of griseofulvin loaded deformable membrane vesicles in optimized guinea pig model of *Microsporum canis*—Dermatophytosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 437, n. 1-2, p. 277-287, 2012.
- AGRAWAL, S.; NANDEIBAM, J.; DEVI, I. Danger of exposure to keratinophilic fungi and other dermatophytes in recreational place in the northeast region of India. **Aerobiologia**, p. 1-12, 2021.
- AGUILAR F. G.; ARAUJO L.P.; ARCE, N.; MARTÍNEZ M. M. Dermatofitos: casuística en la Sección de Micología del Laboratorio Central de Salud Pública, Asunción-Paraguay (2000-2016). **Revista del Nacional (Itauguá)**, v. 9, n. 2, p. 4-11, 2017.
- AJELLO, L. Natural history of the dermatophytes and related fungi. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 53, n. 1-4, p. 93-110, 1974.
- AL JANABI, A. A.; AL KHIKANI, F. H. Dermatophytoses: A short definition, pathogenesis, and treatment. **International Journal of Health & Allied Sciences**, v. 9, n. 3, p. 211, 2020.
- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 999-1008, 2006.
- ALI, F. A. H. A.; AL-JANABI, J. K. A. Phenotypic and molecular identification of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum gypseum* of dermatophytosis. **Journal of Global Pharma Technology**, v.10, n.9, p.103-111, 2017.
- ARAYA, S.; TESFAYE, B.; FENTE, D. Epidemiology of dermatophyte and non-dermatophyte fungi infection in Ethiopia. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 13, p. 291, 2020.
- BAGHEL, S.; NAIR, V. S.; PIRANI, A.; SRAVANI, A. B.; BHEMISETTY, B.; ANANTHAMURTHY, K.; ARANJANI, J.M.; LEWIS, S. A. Luliconazole-loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of superficial *Tinea* infections. **Dermatologic Therapy**, v. 33, n. 6, p. e13959, 2020.
- BAJWA, J. Feline dermatophytosis: Clinical features and diagnostic testing. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 61, n. 11, p. 1217, 2020.
- BALDO, A.; MATHY, A.; TABART, J.; CAMPONOVA, P.; VERMOUT, S.; MASSART, L.; MARÉCHAL, F.; GALLEN, M.; MIGNON, B. Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporum canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. **British Journal of Dermatology**, v. 162, n. 5, p. 990-997, 2010.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.

- BAR, J.; SAMUELOV, L.; SPRECHER, E.; MASHIAH, J. Griseofulvin vs terbinafine for paediatric *tinea capitis*: when and for how long. **Mycoses**, v. 62, n. 10, p. 949-953, 2019.
- BARANOVÁ, Z.; KAMPE, T.; DORKO, E.; RIMÁROVÁ, K. Epidemiological and clinical aspects of dermatophytoses in Eastern Slovakia: A retrospective three-year study. **Central European Journal of Public Health**, v. 26, p. S72-S75, 2018.
- BEGUM, J.; KUMAR, R. Prevalence of dermatophytosis in animals and antifungal susceptibility testing of isolated *Trichophyton* and *Microsporum* species. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 1, p. 1-8, 2021.
- BEGUM, J.; MIR, N. A.; LINGARAJU, M. C.; BUYAMAYUM, B.; DEV, K. Recent advances in the diagnosis of dermatophytosis. **Journal of Basic Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 293-303, 2020.
- BERGMAN, A.; HEIMER, D.; KONDORI, N.; ENROTH, H. Fast and specific dermatophyte detection by automated DNA extraction and real-time PCR. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 4, p. E205-E211, 2013.
- BERKOW, E. L.; LOCKHART, S. R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and Drug Resistance**, v. 10, p. 237, 2017.
- BHAT, Y. J.; ZEERAK, S.; KANTH, F.; YASEEN, 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 centre. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 8, n. 2, p. 100, 2017.
- BHATIA, A.; KANISH, B.; BADYAL D. K.; KATE, P.; CHOUDHARY, S. Efficacy of oral terbinafine versus itraconazole in treatment of dermatophytic infection of skin—a prospective, randomized comparative study. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 51, n. 2, p.116, 2019.
- BOEHM, T. M. S. A; MUELLER, R.S. Dermatophytosis in dogs and cats-an update. **Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere**, v. 47, n. 4, p. 257-268, 2019.
- BONCI, M. M.; MAKITA, M. T.; DE ALMEIDA MENDES, C.; DE ABREU, D. P. B.; RIBEIRO, L. V.; DUARTE, G. A. B.; CAMPOS, S. G.; PAULA, C. R.; DE ASSIS BARONI, F. *In vitro* virulence evaluation of clinical and environmental isolates of dermatophyte fungi. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e21110615699-e21110615699, 2021.
- BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R. O.; DENNING, D. W. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.
- BONTEMS, O.; FRATTI, M.; SALAMIN, K.; GUENOVA, E.; MONOD, M. Epidemiology of Dermatophytoses in Switzerland According to a Survey of Dermatophytes Isolated in Lausanne between 2001 and 2018. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, p. 95, 2020.
- BORAL, H.; METIN, B.; DÖĞEN, A.; SEYEDMOUSAVI, S.; ILKIT, M. Overview of selected virulence attributes in *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus*

*neoformans*, *Trichophyton rubrum*, and *Exophiala dermatitidis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 111, p. 92-107, 2018.

BORMAN, A. M.; FRASER, M.; PALMER, M. D.; SZEKELY, A.; HOULDSWORTH, M.; PATTERSON, Z.; JOHNSON, E. M. MIC distributions and evaluation of fungicidal activity for amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole and caspofungin and 20 species of pathogenic filamentous fungi determined using the CLSI broth microdilution method. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, p. 27, 2017.

BRILHANTE, R. S. N.; CORREIA, E. E. M.; GUEDES, G. 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.; ROCHA, M. F. G. Quantitative and structural analyses of the *in vitro* and *ex vivo* biofilm-forming ability of dermatophytes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 1045-1052, 2017.

BRILHANTE, R. S. N.; COSTA, A. D. C.; PEREIRA, V. S.; FERNANDES, M. R.; DE OLIVEIRA, J. S.; RODRIGUES, A. M.; CAMARGO, Z. P.; NETO, W. A. P.; SIDIRM, J. J. C.; ROCHA, M. F. Antifungal activity of deferiprone and EDTA against *Sporothrix* spp.: Effect on planktonic growth and biofilm formation. **Medical Mycology**, v. 59, n. 6, p. 537-544, 2021.

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 Pacific Journal of Tropical Medicine**, 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, p. 001018, 2021.

BRILHANTE, R. S.; PAIXÃO, G. C.; SALVINO, L. K.; DIÓGENES, M. J. N.; BANDEIRA, S. P.; ROCHA, M. F. G.; 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 da *Tinea capitis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 417-425, 2000.

BRILHANTE, R. S.; PEREIRA, V. S.; OLIVEIRA, J. S.; LOPES, R. G. P.; RODRIGUES, A. M.; CAMARGO Z. P.; PEREIRA-NETO, W. A.; CASTELO-BRANCO D. S. C. M.; CORDEIRO R. A.; SIDRIM J. J. C.; ROCHA, M. F. Pentamidine inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. **Future Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 1129-1140, 2018.

BRILHANTE, R.S N; CORREIA, E. E. M.; GUEDES, G. M. D. M.; DE OLIVEIRA, J. S.; CASTELO-BRANCO, D. D. S. C. M.; CORDEIRO, R. D. A.; PINHEIRO, A. Q.; HAVES, L. J.Q.; NETO, W. A. P.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M.F.G. *In vitro* activity of azole derivatives and griseofulvin against planktonic and biofilm growth of clinical isolates of dermatophytes. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 449-454, 2018.

- BURKHARTA, C. N.; BURKHART, C. G.; GUPTA, A. K. Dermatophytoma: recalcitrance to treatment because of existence of fungal biofilm. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 47, n. 4, p. 629-631, 2002.
- CAFARCHIA, C.; IATTA, R.; LATROFA, M. S.; GRÄSER, Y.; OTRANTO, D. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 20, p. 336-351, 2013.
- CASTELO-BRANCO, D. D. S. C. M.; AGUIAR, L. D.; ARAÚJO, G. D. S.; LOPES, R. G. P.; SALES, J. D. A.; PEREIRA-NETO, W. A.; PINHEIRO, A. Q.; PAIXÃO, G. C.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. *In vitro* and *ex vivo* biofilms of dermatophytes: a new panorama for the study of antifungal drugs. **Biofouling**, v. 36, n. 7, p. 783-791, 2020.
- CHAIGNON, P.; SADOVSKAYA, I.; RAGUNAH, C.; RAMASUBBU, N.; KAPLAN, J. B.; JABBOURI, S. Susceptibility of *Staphylococcal* biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 125-132, 2007.
- CHATTERJI, B. P.; JINDAL, B.; SRIVASTAVA, S.; PANDA, D. Microtubules as antifungal and antiparasitic drug targets. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 21, n. 2, p. 167-186, 2011.
- CHEN, C.; KRISHNAN, V.; MACON, K.; MANNE, K.; NARAYANA, S. V.; SCHNEEWIND, O. Proteases secretadas controlam o crescimento de biofilme mediado por autolisina de *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 41, pág. 29440-29452, 2013.
- CHEN, X.; JIANG, X.; YANG, M.; GONZALEZ, U.; LIN, X.; HUA, X.; XUE, S.; ZHANG, M.; BENNETT, C. Systemic antifungal therapy for *tinea capitis* in children. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 5, 2016.
- CHOLLET, A.; CATTIN, V.; FRATTI, M.; MIGNON, B.; MONOD, M. Which fungus originally was *Trichophyton mentagrophytes*? Historical review and illustration by a clinical case. **Mycopathologia**, v. 180, n. 1, p. 1-5, 2015.
- CLSI. 2017. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3rd ed.** CLSI standard M38. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- CONJEEVARAM, G.; VONGTHAVARAVAT, V.; SUMNER, R.; KOFF, R. S. Terbinafine-induced hepatitis and pancytopenia. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 46, n. 8, p. 1714, 2001.
- CORDEIRO, R.A.; DE OLIVEIRA, J.S.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; TEIXEIRA, C.E.; MARQUES, F.J.; BITTENCOURT, P.V.; CARVALHO, V.L.; BANDEIRA, T.J.; BRILHANTE, R.S.; MOREIRA, J.L.; PEREIRA-NETO, W.A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F. *Candida tropicalis* isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors. **Sabouraudia**, v. 53, n. 2, p. 145-152, 2014.
- COSTA-ORLANDI, C. B., SARDI, J. C., PITANGUI, N. S., DE OLIVEIRA, H. C., SCORZONI, L., GALEANE, M. C.; MEDINA-ALARCÓN, K. P.; MELO, W. C. M. A.;

MARCELINO, M. Y.; BRAZ, J. D.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, p. 22, 2017.

COSTA-ORLANDI, C. B.; SARDI, J. C. O.; SANTOS, C. T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. *In vitro* characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719-727, 2014.

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

CRUZ, Rodrigo; CARVAJAL, Laura. Frecuencia de *Epidermophyton floccosum* en dermatofitos aislados en un laboratorio de la Región de Valparaíso, Chile. Período 1980-2010. **Revista Chilena de Infectología**, v. 35, n. 3, p. 262-265, 2018.

CUNHA, M. M.; CAPOTE-BONATO, F.; CAPOCI, I. R. G.; BONATO, D. V.; GHIZZI, L. G.; PAIVA-LIMA, P.; BAEZA, L. C.; INEZ, T.; SVIDZINSKI, T. I. E. Epidemiological investigation and molecular typing of dermatophytosis caused by *Microsporum canis* in dogs and cats. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 167, p. 39-45, 2019.

CZAIKA, V. A.; LAM, P. A. *Trichophyton mentagrophytes* cause underestimated contagious zoophilic fungal infection. **Mycoses**, v. 56, p. 33-37, 2013.

DARKES, M. J. M.; SCOTT, L. J.; GOA, K. L. Terbinafine. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 4, n. 1, p. 39-65, 2003.

DASTGHAIB, L.; AZIZZADEH, M.; JAFARI, P. Therapeutic options for the treatment of *tinea capitis*: griseofulvin versus fluconazole. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 16, n. 1, p. 43-46, 2005.

DAWSON, C. O.; GENTLES, J. C. The perfect states of *Keratinomyces ajelloi* van-Breuseghem, *Trichophyton terrestre* Durie & Frey and *Microsporum nanum* Fuentes. **Sabouraudia**, v. 1, n. 1, p. 49-57, 1962.

DE FREITAS, R. S.; DE FREITAS, T. H. P.; SIQUEIRA, L. P. M.; GIMENES, V. M. F.; BENARD, G. First report of tinea corporis caused by *Arthroderma benhamiae* in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 985-987, 2019.

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

DE HOOG, G.S.; CHATURVEDI, V.; DENNING, D.; DYER, P.S.; FRISVAD, J.C.; GEISER, D.; GRÄSER Y.; GUARRO, J.; HAASE, G.; KWON-CHUNG, K.J.; MEIS, J. F.; MEYER, W.; PITT, J.I.; SAMSON, R.A.; TAYLOR, J.W.; TINTELNOT, K.; VITALE, R.G.; WALSH, T.J.; LACKNER, M. Name changes in medically important fungi and their implications for clinical practice. **Journal of Clinical Microbiology**, v.53, n.4, p. 1056-1062, 2015.

DE OLIVEIRA SANTOS, G. C.; VASCONCELOS, C. C.; LOPES, A. J.; DE SOUSA CARTÁGENES, M. D. S.; DO NASCIMENTO, F. R.; RAMOS, R. M.; PIRES, E. R. R. B.; DE ANDRANDE, M. S.; ROCHA, F. M. G.; DE ANDRADE MONTEIRO, C. *Candida*

infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1351, 2018.

DE OLIVEIRA, R. B.; ATOBE, J. H.; SOUZA, S. A.; SANTOS, D. W. D. C.  
L. Epidemiology of invasive fungal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome at a reference hospital for infectious diseases in Brazil. **Mycopathologia**, v. 178, n. 1-2, p. 71-78, 2014.

DEL POZO, J. L. Biofilm-related disease. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 16, n. 1, p. 51-65, 2018.

DI VEROLI, G. Y.; FORNARI, C.; WANG, D.; MOLLARD, S.; BRAMHALL, J. L.;  
RICHARDS, F. M.; JODRELL, D. I. Combenefit: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. **Bioinformatics**, v. 32, n. 18, p. 2866-2868, 2016.

DIACONU, O.; SIRIOPOL, I.; POLOȘANU, L. I.; GRIGORAȘ, I. Endotracheal tube biofilm and its impact on the pathogenesis of ventilator-associated pneumonia. **The Journal of Critical Care Medicine**, v. 4, n. 2, p. 50, 2018.

DOGRA, S.; UPRETY, S. The menace of chronic and recurrent dermatophytosis in India: is the problem deeper than we perceive? **Indian Dermatology Online Journal**, v. 7, n. 2, p. 73, 2016.

DOLENC-VOLJČ, M. Dermatophyte infections in humans: current trends and future prospects. **Medical Mycology: Current Trends and Future Prospects. Boca Raton, FL: CRC**, p. 3-27, 2016.

DOMINGUEZ, E. G.; ZARNOWSKI, R.; CHOY, H. L.; ZHAO, M.; SANCHEZ, H.; NETT, J. E.; ANDES, D. R. Conserved role for biofilm matrix polysaccharides in *Candida auris* drug resistance. **Msphere**, v. 4, n. 1, p. e00680-18, 2019.

DOMINGUEZ, E.; ZARNOWSKI, R.; SANCHEZ, H.; COVELLI, A.S.; WESTLER, W.M.; AZADI, P.; NETT, J.; MITCHELL, A.P.; ANDES, D.R. Conservation and divergence in the *Candida* species biofilm matrix mannan-glucan complex structure, function, and genetic control. **MBio**, v. 9, n. 2, p. e00451-18, 2018.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 277, 2001.

EBRAHIMI, M.; ZARRINFAR, H.; NASERI, A.; NAJAFZADEH, M. J.; FATA, A.; PARIAN, M.; KHORSAND, I.; BABIČ, M. N. Epidemiology of dermatophytosis in northeastern Iran; A subtropical region. **Current Medical Mycology**, v. 5, n. 2, p. 16, 2019.

ELADAWY, M.; EL-MOWAFY, M.; EL-SOKKARY, M. M. A.; BARWA, R. Effects of lysozyme, proteinase k, and cephalosporins on biofilm formation by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2020, p. 1-9, 2020.

ESFIDANI, M.; AYATOLLAHI MOUSAVI, S. A.; YAZDANPARAST, S. A.; SHAFIEE, M.; MOHSENZADEGAN, M. Determination of changes in the expression of MIR-212 and EGFR genes in clinical samples from areas infected with *Trichophyton rubrum* compared with non-infected areas. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 11, n. 11, 2018.

ESPINEL-INGROFF, A. V. The origin of mycology. In: **Medical Mycology in the United States**. Springer, Dordrecht, 2003. p. 1-9.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 2012.

FAROKHIPOR, S.; GHIASIAN, S. A.; NAZERI, H.; KORD, M.; DIDEHDAR, M. Characterizing the clinical isolates of dermatophytes in Hamadan city, Central west of Iran, using PCR-RLFP method. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, n. 1, p. 101-105, 2018.

FARRELL, J. R.; ROBERT, E. RNA methodologies. **Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine**, 2006.

FAWAY, É.; LAMBERT DE ROUVROIT, C.; POUMAY, Y. *In vitro* models of dermatophyte infection to investigate epidermal barrier alterations. **Experimental Dermatology**, v. 27, n. 8, p. 915-922, 2018.

FERGUSON, L.; FULLER, L. Claire. Spectrum and burden of dermatophytes in children. **Journal of Infection**, v. 74, p. S54-S60, 2017.

FERREIRA, G. N.; MONTEIRO, G. A.; PRAZERES, D. M.; CABRAL, J. M. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 9, p. 380-388, 2000.

FLEMMING, H. C. Cohesiveness in biofilm matrix polymers. **Community Structure and Cooperation in Biofilms**, p. 87-105, 2000.

FLEMMING, H. C. WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563-575, 2016.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FRÍAS-DE-LEÓN, M. G.; MARTÍNEZ-HERRERA, E.; ATOCHE-DIÉGUEZ, C. E.; GONZÁLEZ-CESPÓN, J. L.; URIBE, B.; ARENAS, R.; RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. Molecular identification of isolates of the *Trichophyton mentagrophytes* complex. **International Journal of Medical Sciences**, v. 17, n. 1, p. 45, 2020.

FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; PENNISI, M. G.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; HARTMANN, K.; HOSIE, M. J.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; MÖSTL, K.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Dermatophytosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 598-604, 2013.

GALUPPI, R.; LEVEQUE, J. F.; BEGHELLI, V.; BONOLI, C.; MATTIOLI, M.; OSTANELLO, F.; TAMPIERI, M. P.; ACCORSI, P. A. Cortisol levels in cats' hair in presence or absence of *Microsporium canis* infection. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 3, p. 1076-1080, 2013.

GAMAGE, H.; SIVANESAN, P.; HIPLER, U. C.; ELSNER, P.; WIEGAND, C. Superficial fungal infections in the department of dermatology, University Hospital Jena: A 7-year



retrospective study on 4556 samples from 2007 to 2013. **Mycoses**, v. 63, n. 6, p. 558-565, 2020.

GARBER, G. An overview of fungal infections. **Drugs**, v. 61, n. 1, p. 1-12, 2001.

GHANNOUM, M. Azole Resistance in Dermatophytes Prevalence and Mechanism of Action. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 106, n. 1, p. 79-86, 2016.

GHÉCZY, N.; KÜCHLER, A.; WALDE, P. Proteinase K activity determination with  $\beta$ -galactosidase as sensitive macromolecular substrate. **Analytical biochemistry**, v. 513, p. 54-60, 2016.

GINTER-HANSELMAYER, G.; NENOFF, P. Clinically relevant mycoses dermatomycoses. **Clinically Relevant Mycoses**. Springer, Cham, p. 145-176, 2018.

GNAT, S.; ŁAGOWSKI, D.; NOWAKIEWICZ, A.; DYLAG, M.; OSIŃSKA, M.; SAWICKI, M. Detection and identification of dermatophytes based on currently available methods-a comparative study. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 1, p. 278-291, 2021.

GNAT, S.; ŁAGOWSKI, D.; NOWAKIEWICZ, A.; OSIŃSKA, M.; KOPÍŃSKI, Ł. Population differentiation, antifungal susceptibility, and host range of *Trichophyton mentagrophytes* isolates causing recalcitrant infections in humans and animals. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 11, p. 2099-2113, 2020.

GNAT, S.; ŁAGOWSKI, D.; NOWAKIEWICZ, A.; ZIĘBA, P. Phenotypic characterization of enzymatic activity of clinical dermatophyte isolates from animals with and without skin lesions and humans. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 700-709, 2018.

GNAT, S.; ŁAGOWSKI, D.; NOWAKIEWICZ, A.; ZIĘBA, P. *Tinea corporis* by *Microsporum canis* in mycological laboratory staff: unexpected results of epidemiological investigation. **Mycoses**, v. 61, n. 12, p. 945-953, 2018.

GNAT, S.; NOWAKIEWICZ, A.; ZIÓŁKOWSKA, G.; TROŚCIAŃCZYK, A.; MAJER-DZIEDZIC, B.; ZIĘBA, P. Evaluation of growth conditions and DNA extraction techniques used in the molecular analysis of dermatophytes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 5, p. 1368-1379, 2017.

GOGTAY, N. J.; KULKARNI, U. P.; PANCHABHAI, T. S. Adverse reactions to antifungal agents. **Adverse Drug Reaction Bulletin**, n. 251, p. 963-966, 2008.

GOKHALE, V.M.; KULKARNI, V. M. Understanding the antifungal activity of terbinafine analogues using quantitative structure–activity relationship (QSAR) models. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 10, p. 2487-2499, 2000.

GÖTZ, H. The Influence of Dermatology on the Development of Medical Mycology. **Mycoses**, v. 21, n. 1, p. 3-7, 1978.

GRÄSER Y.; MONOD, M.; BOUCHARA, J.P.; DUKIK, K.; NENOFF, P.; KARGL, A.; KUPSCH, C.; ZHAN, P.; PACKEU, A.; CHATURVEDI, V. New insights in dermatophytes research. **Medical Mycology**, v. 56, n. 1, p.2-9, 2018.

GRÄSER, Y.; DE HOOG, G.S.; KUIJPERS, A.F.A. Recent advances in the molecular taxonomy of dermatophytes. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.17, p.17-21, 2000.

GRÄSER, Y.; SCOTT, J.; SUMMERBELL, R. The new species concept in dermatophytes—a polyphasic approach. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 239, 2008.

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.

GROVER, C.; KHURANA, A. Onychomycosis: newer insights in pathogenesis and diagnosis. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 78, n. 3, p. 263, 2012.

GU, D.; HATCH, M.; GHANNOUM, M.; ELEWSKI, B. E. Treatment-resistant dermatophytosis: A representative case highlighting an emerging public health threat. **JAAD Case Reports**, v. 6, n. 11, p. 1153-1155, 2020.

GUO, J.; BROSNAN, B.; FUREY, A.; ARENDT, E.; MURPHY, P.; COFFEY, A. Antifungal activity of *Lactobacillus* against *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* and *Epidermophyton floccosum*. **Bioengineered**, v. 3, n. 2, p. 104-113, 2012.

GUPTA, A. K.; FOLEY, K. A. Evidence for biofilms in onychomycosis. **Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia: Organo ufficiale, Societa Italiana di Dermatologia e Sifilografia**, v. 154, n. 1, p. 50-55, 2018.

GUPTA, A. K.; STEC, N.; BAMIMORE, M. A.; FOLEY, K. A.; SHEAR, N. H.; PIGUET, V. The efficacy and safety of pulse vs. continuous therapy for dermatophyte toenail onychomycosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 34, n. 3, p. 580-588, 2020.

GUPTA, A. K.; WILLIAMS, J. V.; ZAMAN, M.; SINGH, J. *In vitro* pharmacodynamic characteristics of griseofulvin against dermatophyte isolates of *Trichophyton tonsurans* from *tinea capitis* patients. **Medical Mycology**, v. 47, n. 8, p. 796-801, 2009.

GUPTA, A. K.; DAIGLE, D.; CARVIEL, J. L. The role of biofilms in onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 6, 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.

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

HARIU, M.; WATANABE, Y.; SHIMADA, D.; IMAI, H.; TAKANO, K.; KAMIOKA, Y.; SEKI, M. A household *Microsporum canis* dermatophytosis sugerida por matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry analysis. **The American Journal of Case Reports**, v. 22, p. e930713-1, 2021.

HARRISON, S.; SINCLAIR, R. Optimal management of hair loss (alopecia) in children. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 4, n. 11, p. 757-770, 2003.

HATHROUBI, S.; ZEREBINSKI, J.; CLARKE, A.; OTTEMANN, K. M. *Helicobacter pylori* biofilm confers antibiotic tolerance in part via a protein-dependent mechanism. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 355, 2020.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological research**, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001.

HEDAYATI, M. T.; ANSARI, S.; AHMADI, B.; ARMAKI, M. T.; SHOKOHI, T.; ABASTABAR, M.; ER, H.; ÖZHAK, B.; ÖĞÜNÇ, D.; ILKIT, M.; SEYEDMOUSAVI, S. Identification of clinical dermatophyte isolates obtained from Iran by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Current Medical Mycology**, v. 5, n. 2, p. 22, 2019.

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

HOF, H. A new, broad-spectrum azole antifungal: posaconazole—mechanisms of action and resistance, spectrum of activity. **Mycoses**, v. 49, p. 2-6, 2006.

HOHAUS, K.; VENNEWALD, I.; WOLLINA, U. Deep mycosis caused by *Trichophyton mentagrophytes* in a diabetic patient. **Mycoses**, v. 46, n. 8, p. 337-339, 2003.

HØIBY, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. **Apmis**, v. 125, n. 4, p. 272-275, 2017.

HU, X.; HUANG, Y. Y.; WANG, Y.; WANG, X.; & HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1299, 2018.

IKRAM, S.; HEIKAL, A.; FINKE, S.; HOFGAARD, A.; REHMAN, Y.; SABRI, A. N.; ØKSTAD, O. A. *Bacillus cereus* biofilm formation on central venous catheters of hospitalised cardiac patients. **Biofouling**, v. 35, n. 2, p. 204-216, 2019.

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

INDARJULIANTO, S.; PURNAMANINGSIH, H.; WIKANSARI, P.; SAKAN, G. Y. I. Isolation and identification of *Microsporum canis* from dermatophytosis dogs in Yogyakarta. **Jurnal Veteriner**, v. 15, n. 2, p. 212-216, 2014.

IWASKIENE, M.; MATUSEVICIUS, A. P.; GRIGONIS, A.; ZAMOKAS, G.; BABICKAITE, L. Efficacy of topical therapy with newly developed terbinafine and econazole formulations in the treatment of dermatophytosis in cats. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 3, 2016.

JASMIN, C.; CHELLAPPAN, S.; SUKUMARAN, R. K.; ELYAS, K. K.; BHAT, S. G.; CHANDRASEKARAN, M. Molecular cloning and homology modelling of a subtilisin-like serine protease from the marine fungus, *Engyodontium album* BTMFS10. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1269-1279, 2010.

- JHA, K.; SHAW, D.; KARIM, A.; NARANG, T.; SAIKIA, B.; RUDRAMURTHY, S. M.; SAIKIA, U. N.; DOGRA, S. Immunological response and clinical profile in patients with recurrent dermatophytosis. **Mycoses**, 2021.
- JOHNSON, E. M.; CAVLING-ARENDRUP, M. Susceptibility test methods: yeasts and filamentous fungi. **Manual of Clinical Microbiology**, p. 2255-2281, 2015.
- JOSHI, S.; SHRESTHA, S.; TIMOTHY, U.; JHA, A. K.; THAPA, D. P. Health seeking behavior and cost of care of chronic dermatophytosis: A hospital-based cross-sectional study. **Nepal Medical College Journal**, v. 22, n. 3, p. 181-188, 2020.
- KADHIM, O. H. The incidence of dermatophytosis in Babylon Province, Iraq. **Medical Journal of Babylon**, v. 15, n. 3, p. 234, 2018.
- KAMILOGLU, S.; SARI, G.; OZDAL, T.; CAPANOGLU, E. 2020. Guidelines for cell viability assays. **Food Frontiers**, v. 1, n. 3, p. 332-349, 2020.
- KANBE, T. Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 307, 2008.
- KARKOWSKA-KULETA, J.; KULIG, K.; KARNAS, E.; ZUBA-SURMA, E.; WOZNICKA, O.; PYZA, E.; KULETA, P.; OSYCZKA, A.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Characteristics of extracellular vesicles released by the pathogenic yeast-like fungi *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1722, 2020.
- KARYGIANNI, L.; ATTIN, T.; THURNHEER, T. Combined DNase and proteinase treatment interferes with composition and structural integrity of multispecies oral biofilms. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 983, 2020.
- KASSEM, M. A.; ESMAT, S.; BENDAS, E. R.; EL-KOMY, M. H. Efficacy of topical griseofulvin in treatment of *tinea corporis*. **Mycoses**, v. 49, n. 3, p. 232-235, 2006.
- KASSIM, A.; OMUSE, G.; PREMJI, Z.; REVATHI, G. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2016.
- KAUR, P.; GANJOO, S.; SAWHNEY, M. P. S.; AGARWAL, P.; GUPTA, N.; CHAMOLA, S. Clinico-epidemiologic profile of dermatophytosis in koh positive patients in a tertiary care hospital in Gurugram, Haryana. **Indian Journal of Health Sciences and Care**, v. 7, n. 2, p. 51-57, 2020.
- KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging skin: histology, physiology, and pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics**, v. 19, n. 2, p. 229-234, 2011.
- KHURANA, A.; SARDANA, K.; CHOWDHARY, A. Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. **Fungal Genetics and Biology**, v. 132, p. 103255, 2019.

KIM, M. J.; LIM, E. S.; KIM, J. S. Enzymatic inactivation of pathogenic and nonpathogenic bacteria in biofilms in combination with chlorine. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 4, p. 605–614, 2019.

KIRAZ, N.; METINTAS, S.; OZ, Y.; KOC, F.; KOKU AKSU, E. A.; KALYONCU, C.; KASIFOGLU, N.; CETIN, E.; ARIKAN, İ. The prevalence of *tinea pedis* and *tinea manuum* in adults in rural areas in Turkey. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 20, n. 5, p. 379-386, 2010.

KONDORI, N.; SVENSSON, E.; MATTSBY-BALTZER, I. *In vitro* susceptibility of filamentous fungi to itraconazole, voriconazole and posaconazole by Clinical and Laboratory Standards Institute reference method and E-test. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. e318-e322, 2011.

KONG, E. F.; TSUI, C.; KUCHARÍKOVÁ, S.; ANDES, D.; VAN DIJCK, P.; JABRA-RIZK, M. A. Commensal protection of *Staphylococcus aureus* against antimicrobials by *Candida albicans* biofilm matrix. **MBio**, v. 7, n. 5, p. e01365-16, 2016.

KONTOYIANNIS, D. P. Antifungal resistance: an emerging reality and a global challenge. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl\_3, p. S431-S435, 2017.

KOO, H.; ALLAN, R. N.; HOWLIN, R. P.; SSTANDLEY, P.; HALL-SKOWNLEY, L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 740-755, 2017.

KOUPAEI, M. H.; SHAREGHI, B.; SABOURY, A. A.; DAVAR, F.; SEMNANI, A.; EVINI, M. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles and their effect on the stability and activity of proteinase K. **RSC Advances**, v. 6, n. 48, p. 42313-42323, 2016.

KRAWCZYK P.; CZELEŃ P.; SZEFLER B.; CYSEWSKI P. Theoretical studies on the interaction between chalcone dyes and Concanavalin A—The reactive group effects on the photophysical and biological properties of the fluorescence probe. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 346, p. 327-337, 2017.

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

L'OLLIVIER, C., CASSAGNE, C., NORMAND, A. C., BOUCHARA, J. P., CONTET-AUDONNEAU, N., HENDRICKX, M., FOURQUET, P.; COULIBALY, O.; PIARROUX, R.; RANQUE, S. A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. **Medical Mycology**, v. 51, n. 7, p. 713-720, 2013.

LANA, A. J. D.; PIPPI, B.; CARVALHO, A. R.; MORAES, R. C.; KAISER, S.; ORTEGA, G. G.; FUENTEFRIA, A. M.; SILVEIRA, G. P. *In vitro* additive effect on griseofulvin and terbinafine combinations against multidrug-resistant dermatophytes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, 2018.

LATTIF, A. A.; MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J.; ROTH, M. R.; WELTI, R.; ROUABHIA, M.; GHANNOUM, M. A. Lipidomics of *Candida albicans* biofilms reveals phase-dependent production of phospholipid molecular classes and role for lipid rafts in biofilm formation. **Microbiology**, v. 157, n. Pt 11, p. 3232, 2011.

- LEDERER, S.; DIJKSTRA, T. M. H.; HESKES, T. Additive dose response models: defining synergy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1384, 2019.
- LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14 $\alpha$ -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1770, n. 3, p. 467-477, 2007.
- LEUNG, A. K. C.; LEONG, K. F.; LAM, J. M. *Tinea imbricata*: an overview. **Current Pediatric Reviews**, v. 15, n. 3, p. 170-174, 2019.
- LEUNG, A. K.; LAM, J. M.; LEONG, K. F.; HON, K. L. *Tinea corporis*: An updated review. **Drugs in Context**, v. 9, 2020.
- LI, XI-HUI; LEE, JOON-HEE. Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 753-766, 2017.
- 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
- LIPNER, S. R.; SCHER, R. K. Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 4, p. 835-851, 2019.
- MADDY, A. J.; TOSTI, A. Systemic Treatment of Onychomycosis. **Onychomycosis: Diagnosis and Effective Management**, p. 118-122, 2018.
- MAJID, I.; SHEIKH, G.; KANTH, F.; HAKAK, R. Relapse after oral terbinafine therapy in dermatophytosis: a clinical and mycological study. **Indian Journal of Dermatology**, v. 61, n. 5, p. 529, 2016.
- MARAKI, S.; MAVROMANOLAKI, V. E. Epidemiology of Dermatophytoses in Crete, Greece a 5-year Survey. **Medical Mycology Journal**, v. 57, n. 4, p. E69-E75, 2016.
- MAROÑAS JIMÉNEZ, L.; MONSÁLVEZ, V.; GUTIÉRREZ GARCÍA-RODRIGO, C.; POSTIGO LLORENTE, C. *Tinea imbricata* as a clue to occult immunodeficiency. **Pediatric Dermatology**, v. 31, n. 6, p. e126-e127, 2014.
- MARTÍNEZ-GOMARIZ, M.; PERUMAL, P.; MEKALA, S.; NOMBELA, C.; CHAFFIN, W. L.; GIL, C. Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*. **Proteomics**, v. 9, n. 8, p. 2230-2252, 2009.
- MARTINEZ-ROSSI, N. M.; BITENCOURT, T. A.; PERES, N. T.; LANG, E. A.; GOMES, E. V.; QUARESEMIN, N. R.; MARTINS, M.P.; LOPES, L.; ROSSI, A. Dermatophyte resistance to antifungal drugs: mechanisms and prospectus. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1108, 2018.
- MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5, p. 369-383, 2008.
- MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERSINOTI, G. F.; PERES, N. T.; ROSSI, A. Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses. **Mycoses**, v. 55, n. 5, p. 381-387, 2012.

MARTINS, M. P.; FRANCESCHINI, A. C. C.; JACOB, T. R.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Compensatory expression of multidrug-resistance genes encoding ABC transporters in dermatophytes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 605-610, 2016.

MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; OLIVEIRA, R. Addition of DNase improves the *in vitro* activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. **Mycoses**, v. 55, n. 1, p. 80-85, 2012.

MARTINS, M.; UPPULURI, P.; THOMAS, D.P.; CLEARY, I.A.; HENRIQUES, M.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; OLIVEIRA, R. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**, v. 169, n. 5, p. 323-331, 2010.

MCADAM, A. J. The divergent meanings of "I" for the Clinical and Laboratory Standards Institute and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: a micro-comic strip. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 4, 2019.

MERCER, D. K.; STEWART, C. S. Keratin hydrolysis by dermatophytes. **Medical Mycology**, v. 57, n. 1, p. 13-22, 2019.

MIKAEILI, A.; KAVOUSSI, H.; HASHEMIAN, A. H.; GHESHTEMI, M. S.; KAVOUSSI, R. Clinico-mycological profile of *tinea capitis* and its comparative response to griseofulvin versus terbinafine. **Current Medical Mycology**, v. 5, n. 1, p. 15, 2019.

MILLER J. R.; WILLIAM H.; GRIFFIN, C. E.; CAMPBELL, K. L. **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**. Elsevier Health Sciences, 2012.

MINNAT, T. R.; KHALF, J. M. Feline dermatophytosis: epidemiological, clinical and laboratory features in baghdad governorate, IRAQ. **Biochemical and Cellular Archives**, v. 19, n. 2, p. 4025-4033, 2019.

MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. Fungal super glue: the biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 9, p. e1005828, 2016.

MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; SANCHEZ, H.; EDWARD, J. A.; REINICKE, E. L.; NETT, J. E.; MITCHELL, A. P.; ANDES, D. R. Community participation in biofilm matrix assembly and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 13, p. 4092-4097, 2015.

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

MOHTA, A.; SINGH, A.; NYATI, A.; AGRAWAL, A.; NAHAR, D.; LAL, M.; GUPTA, D.; JAIN, S. K. Evaluation of impact of *tinea capitis* on quality of life in pediatric patients using children's dermatology life quality index and its correlation with disease duration. **International Journal of Trichology**, v. 12, n. 5, p. 213, 2020.

MORIELLO, K. A. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of published studies. **Veterinary Dermatology**, v. 15, n. 2, p. 99-107, 2004.

MORIELLO, K. A.; COYNER, K.; PATERSON, S.; MIGNON, B. Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats: Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. **Veterinary Dermatology**, v. 28, n. 3, p. 266–268, 2017.

NARANG, T.; BHATTACHARJEE, R.; SINGH, S.; JHA, K.; MAHAJAN, R.; DOGRA, S. Quality of life and psychological morbidity in patients with superficial cutaneous dermatophytosis. **Mycoses**, v. 62, n. 8, p. 680-685, 2019.

NARDONI, S.; MUGNAINI, L.; PAPINI, R.; FIASCHI, M.; MANCIANTI, F. Canine and feline dermatophytosis due to *Microsporum gypseum*: a retrospective study of clinical data and therapy outcome with griseofulvin. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 23, n. 3, p. 164-167, 2013.

NEGRONI, R. Historical aspects of dermatomycoses. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 125-132, 2010.

NENOFF, P.; KRÜGER, C.; SCHALLER, J.; GINTER-HANSELMAYER, G.; SCHULTE-BEERBÜHL, R.; TIETZ, H.J. Mycology—an update part 2: dermatomycoses: clinical picture and diagnostics. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 12, n. 9, p. 749-777, 2014.

NENOFF P.; VERMA S.B.; VASANI R.; BURMESTER A.; HIPLER U. C.; WITTIG F.; KRÜGER C.; NENOFF K.; WIEGAND C.; SARASWAT A.; MADHU, R.; PANDA, S.; DAS, A.; KURA, M.; JAIN, A.; KOCH, D.; GRÄSER, Y.; UHRLAß, S. The current Indian epidemic of superficial dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*—A molecular study. **Mycoses**, v. 62, n. 4, p. 336-356, 2019.

NEWLAND, J. G.; ABDEL-RAHMAN, S. M. Update on terbinafine with a focus on dermatophytoses. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology: CCID**, v. 2, p. 49, 2009.

NGUYEN, U.T.; BURROWS, L. L. DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 187, p. 26-32, 2014.

NNAGBO, P.A.; ANYAMENE, C.O.; ANYIAM, I.V. Epidemiological status of dermatophytosis among rice farmers in Ebonyi State, Nigeria. **World Scientific News**, v. 155, p. 65-79, 2021.

NWEZE, E. I.; EKE, I. E. Dermatophytes and dermatophytosis in the eastern and southern parts of Africa. **Medical Mycology**, v. 56, n. 1, p. 13-28, 2018.

PAKKULNAN, R.; ANUTRAKUNCHAI, C.; KANTHAWONG, S.; TAWEECHAI SUPAPONG, S.; CHAREONSUDJAI, P.; CHAREONSUDJAI, S. Extracellular DNA facilitates bacterial adhesion during *Burkholderia pseudomallei* biofilm formation. **PLoS One**, v. 14, n. 3, p. e0213288, 2019.

PAL, MAHENDRA; MAHENDRA, RAJ. Dermatophytosis-A Highly Infectious Mycosis of Pet Animals. **International Journal of Livestock Research**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2017.



- PANDA, S.; VERMA, S. The menace of dermatophytosis in India: The evidence that we need. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 83, n. 3, p. 281, 2017.
- PARK, K. Role of micronutrients in skin health and function. **Biomolecules & therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 207, 2015.
- PEIXOTO, I.; MAQUINE, G.; FRANCESCONI, V. A.; FRANCESCONI, F. Dermatophytosis caused by *Tricophyton rubrum* as an opportunistic infection in patients with Cushing disease. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 6, p. 888-890, 2010.
- PEREIRA, R. S.; SANTOS, H. D. H.; MORAES, O. S.; JÚNIOR, D. P. L.; ROSANE C. HAHN. Children's public health: Danger of exposure to pathogenic fungi in recreational places in the middle-west region of Brazil. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n.1, p.51-57, 2020.
- PETERSEN, A. B.; RØNNEST, M. H.; LARSEN, T. O.; CLAUSEN, M. H.; PETERSEN, A. B., RØNNEST, M. H.; LARSEN, T. O.; CLAUSEN, M. H. The chemistry of griseofulvin. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 24, p. 12088-12107, 2014.
- PETRUCCELLI, M. F.; ABREU, M. H. D.; CANTELLI, B. A. M.; SEGURA, G. G.; NISHIMURA, F. G.; BITENCOURT, T. A.; MARINS, M.; FACHIN, A. L. Epidemiology and diagnostic perspectives of dermatophytoses. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 310, 2020.
- PIHET, M.; LE GOVIC, Y. Reappraisal of conventional diagnosis for dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1-2, p. 169-180, 2017.
- PIRES, C. A. A.; CRUZ, N. F. S. D.; LOBATO, A. M.; SOUSA, P. O. D.; CARNEIRO, F. R. O.; MENDES, A. M. D. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, p. 259-264, 2014.
- PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792-798, 2019.
- RAD, B. H.; HASHEMI, S. J.; FARASATINASAB, M.; ATIGHI, J. Epidemiological survey of human dermatophytosis due to zoophilic species in Tehran, Iran. **Iranian Journal of Public Health**, v. 47, n. 12, p. 1930, 2018.
- RAJAGOPALAN, M.; INAMADAR, A.; MITTAL, A.; MISKEEN, A. K.; SRINIVAS, C. R.; SARDANA, K.; GODSE, K.; PATEL, K.; RENGASAMY, M.; RUDRAMURTHY, S.; DOGRA, S. Expert consensus on the management of dermatophytosis in India (ECTODERM India). **BMC Dermatology**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2018.
- RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.
- RAMOS, M. L. M.; COELHO, R. A.; BRITO-SANTOS, F.; GUIMARÃES, D.; PREMAZZI, M.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; OROFINO-COSTA, R.; CARVALHO, M. H. G. F.; ALMEIDA-PAES, R. Comparative analysis of putative virulence-associated factors of *Microsporum canis* isolates from human and animal patients. **Mycopathologia**, v. 185, n. 4, p. 665-673, 2020.

RASHIDIAN, S.; FALAHATI, M.; KORDBACHEH, P.; MAHMOUDI, M.; SAFARA, M.; TAFTI, H.S.; MAHMOUDI, S.; ZAINI, F. A study on etiologic agents and clinical manifestations of dermatophytosis in Yazd, Iran. **Current Medical Mycology**, v. 1, n. 4, p. 20, 2015.

REDDY, K. R. Fungal infections (Mycoses): Dermatophytoses (*Tinea*, Ringworm). **Journal of Gandaki Medical College-Nepal**, v. 10, n. 1, 2017.

RENGASAMY, M.; CHELLAM, J.; GANAPATI, S. Systemic therapy of dermatophytosis: Practical and systematic approach. **Clinical Dermatology Review**, v. 1, n. 3, p. 19, 2017.

RENGASAMY, M.; SHENOY, M. M.; DOGRA, S.; ASOKAN, N.; KHURANA, A.; POOJARY, S.; JAYARAMAN, J.; VALIA, A. R.; SARDANA, K.; KOLALAPUDI, S.; MARFATIA, Y.; RAO, P. N.; BHAT, R. M.; KURA, M.; PANDHI, D.; BARUA, S.; KAUSHAL, V. Indian association of dermatologists, venereologists and leprologists (IADVLL) task force against recalcitrant tinea (ITART) consensus on the management of glabrous tinea (INTACT). **Indian Dermatology Online Journal**, v. 11, n. 4, p. 502, 2020.

REVIE, N. M.; IYER, K. R.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 70-76, 2018.

REX, J.H.; PFALLER, M. A. Has antifungal susceptibility testing come of age? **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 8, p. 982-989, 2002.

RICHARDS, L. S.; MILLÁN, C.; MIAO, J.; MARTYNOWYCZ, M. W.; SAWAYA, M. R.; GONEN, T.; BORGES, R. J.; USÓN, J.; RODRIGUEZ, J. A. Fragment-based determination of a proteinase K structure from MicroED data using ARCIMBOLDO\_SHREDDER. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, v. 76, n. 8, p. 703-712, 2020.

RICHARDSON, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. suppl\_1, p. i5-i11, 2005.

ROANA, J.; MANDRAS, N.; SCALAS, D.; CAMPAGNA, P.; TULLIO, V. Antifungal activity of melaleuca alternifolia essential oil (TTO) and its synergy with itraconazole or ketoconazole against *Trichophyton rubrum*. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 461, 2021.

ROBATI, A.K.; KHALILI, M.; HAZAVEH, S.J.H.; BAYAT, M. Assessment of the subtilisin genes in *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* from dermatophytosis. **Comparative Clinical Pathology**, v. 27, n. 5, p. 1343-1347, 2018.

ROBERT, M. G.; CORNET, M.; HENNEBIQUE, A.; RASAMOELINA, T.; CASPAR, Y.; PONDÉRAND, L.; BIDART, M.; DURAND, H.; JACQUET, M.; GARNAUD, C.; MAUBON, D. MALDI-TOF MS in a medical mycology laboratory: on stage and backstage. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p. 1283, 2021.

RODRIGUES, C. F.; ČERNÁKOVÁ, L. Farnesol and tyrosol: secondary metabolites with a crucial *quorum-sensing* role in *Candida* biofilm development. **Genes**, v. 11, n. 4, p. 444, 2020.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P.; CARBALLO-JUSTO, A.; DRAPER, L. A.; CABO, M. L. Removal of *Listeria monocytogenes* dual-species biofilms using combined enzyme-benzalkonium chloride treatments. **Biofouling**, v. 33, n. 1, p. 45-58, 2017.

- ROMANÍ, A. M.; FUND, K.; ARTIGAS, J.; SCHWARTZ, T.; SABATER, S.; OBST, U. Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 3, p. 427-436, 2008.
- ROSENTHAL, T. Aulus Cornelius Celsus: his contributions to dermatology. **Archives of Dermatology**, v. 84, n. 4, p. 613-618, 1961.
- RUDRAMURTHY, S. M.; SHANKARNARAYAN, S. A.; DOGRA, S.; SHAW, D.; MUSHTAQ, K.; PAUL, R. A.; NARANG, T.; CHAKRABARTI, A. Mutation in the squalene epoxidase gene of *Trichophyton interdigitale* and *Trichophyton rubrum* associated with allylamine resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. e02522-17, 2018.
- SAHOO, A. K.; MAHAJAN, R. Management of *tinea corporis*, *tinea cruris*, and *tinea pedis*: A comprehensive review. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 7, n. 2, p. 77, 2016.
- SARIYANTI, M.; AGUSTRIA, P.M.; HERLAMBANG, W.F. Identification of dermatophyte fungi causing *tinea pedis* and *tinea unguium* in Malabero coastal communities, Bengkulu. **Microbiology Indonesia**, v. 15, n. 1, p. 4, 2021.
- SAXENA, P.; JOSHI, Y.; RAWAT, K.; BISHT, R. Biofilms: architecture, resistance, *quorum sensing* and control mechanisms. **Indian Journal Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 3-12, 2019.
- SCHUMACHER, A.; VRANKEN, T.; MALHOTRA, A.; ARTS, J. J. C.; HABIBOVIC, P. *In vitro* antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 2, p. 187-208, 2018.
- SCORZONI, L.; DE PAULA E SILVA, A. C.; MARCOS, C. M.; ASSATO, P. A.; DE MELO, W. C.; DE OLIVEIRA, H. C.; COSTA-ORLANDI, C. B.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 36, 2017.
- SEELIGER, H. P. R. The Discovery of *Achorion schoenleinii*: \* Facts and "Stories": Die Entdeckung des *Achorion schoenleinii* Tatsachen und „Geschichten". **Mycoses**, v. 28, n. 4, p. 161-182, 1985.
- SHABAA, R. A. H. Microbial study of *Trichophyton rubrum* isolated from various *Tinea* infections. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 14, n. 2, p. 2553-2558, 2020.
- SHALINI, K.; KUMAR, N.; DRABU, S.; SHARMA, P. K. Advances in synthetic approach to and antifungal activity of triazoles. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 668-677, 2011.
- SHARMA, M.; SHARMA, M.; RAO, V. M. *In vitro* biodegradation of keratin by dermatophytes and some soil keratinophiles. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2011.
- SHARMA, P.; BHALLA, M.; THAMI, G. P; CHANDER, J. Evaluation of efficacy and safety of oral terbinafine and itraconazole combination therapy in the management of dermatophytosis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 31, n. 7, p. 749-753, 2020.

SHEPPARD, D. C.; HOWELL, P. L. Biofilm exopolysaccharides of pathogenic fungi: lessons from bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 24, p. 12529-12537, 2016.

SHUKLA, S. K.; RAO, T. S. Dispersal of Bap-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm by proteinase K. **The Journal of Antibiotics**, v. 66, n. 2, p. 55-60, 2013.

SHUKLA, SUDHIR K.; RAO, T. SUBBA. *Staphylococcus aureus* biofilm removal by targeting biofilm-associated extracellular proteins. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 146, n. Suppl 1, p. S1, 2017.

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

SIEDE, W. A. "Hole Punched Plate" method for easy generation and harvesting of microconidia in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Heliyon**, v. 4, n. 7, p. e00676, 2018.

SİĞIRCI, B. D.; METİNER, K.; ÇELİK, B.; KAHRAMAN, B. B.; SERKAN, İ. K. İ. Z.; BAĞCIGİL, A. F.; ÖZGÜR, N. Y.; SEYYAL, A. K. Dermatophytes isolated from dogs and cats suspected dermatophytoses in Istanbul, Turkey within a 15-year-period: an updated report. **Kocatepe Veterinary Journal**, v. 12, n. 2, p. 116-121, 2019.

SILVA-ROCHA, W.P.; DE AZEVEDO, M.F.; CHAVES, G.M. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 1, p. 57-64, 2017.

SILVERMAN, I. M.; LI, F.; ALEXANDER, A.; GOFF, L.; TRAPNELL, C.; RINN, J. L.; GREGORY, B. D. RNase-mediated protein *footprint* sequencing reveals protein-binding sites throughout the human transcriptome. **Genome biology**, v. 15, n. 1, p. 1-16, 2014.

SINGAL, A.; RAWAT, S.; BHATTACHARYA, S. N.; MOHANTY, S.; BARUAH, M. C. Clinico-mycological profile of *tinea capitis* in north India and response to griseofulvin. **The Journal of dermatology**, v. 28, n. 1, p. 22-26, 2001.

SINGH, A.; MASIH, A.; KHURANA, A.; SINGH, P. K.; GUPTA, M.; HAGEN, F.; MEIS, J.F.; CHOWDHARY, A. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 477-484, 2018.

SINGH, B. S.; TRIPATHY, T.; KAR, B. R.; RAY, A. Clinicomycological study of dermatophytosis in a Tertiary Care Hospital in Eastern India: a cross-sectional study. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 11, n. 1, p. 46, 2020.

SINGH, N.; PERFECT, J. R. Immune reconstitution syndrome associated with opportunistic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 395-401, 2007.

SINGH, S.; CHANDRA, U.; ANCHAN, V. N.; VERMA, P.; TILAK, R. Limited effectiveness of four oral antifungal drugs (fluconazole, griseofulvin, itraconazole and terbinafine) in the current epidemic of altered dermatophytosis in India: results of a randomized pragmatic trial. **British Journal of Dermatology**, v. 183, n. 5, p. 840-846, 2020.

- SOORIYA, S.; JAYAPALAN, S.; MINI, G.; MANJUSREE, S.; NANDAKUMAR, L. Chronic dermatophytosis: Clinico-mycological determinants and antifungal susceptibility pattern. **Indian Journal of Dermatology**, v. 66, n. 3, p. 329, 2021.
- SRIRANGANADANE, D.; WARIDEL, P.; SALAMIN, K.; FEUERMAN, M.; MIGNON, B.; STAIB, P.; NEUHAUS, J. M.; QUADRONI, M.; MONOD, M. Identification of novel secreted proteases during extracellular proteolysis by dermatophytes at acidic pH. **Proteomics**, v. 11, n. 22, p. 4422-4433, 2011.
- STOCKDALE, P. M. *Nannizzia incurvata* gen. nov., sp. nov., a perfect state of *Microsporum gypseum* (Bodin) Guiart et Grigorakis. **Sabouraudia**, v. 1, n. 1, p. 41-48, 1962.
- STOCKDALE, P. M. Sexual stimulation between *Arthroderma simii* Stockd., Mackenzie & Austwick and related species. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 6, n. 2, p. 176-181, 1968.
- SU, H.; PACKEU, A.; AHMED, S. A.; AL-HATMI, A. M.; BLECHERT, O.; İLKIT, M.; GRÄSER, Y.; LIU, W.; DENG, S.; HENDRICKX, M.; XU, J.; ZHU, M.; DE HOOG, S. Species distinction in the *Trichophyton rubrum* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 9, p. e00352-19, 2019.
- SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 222-227, 2001.
- TAINWALA, R.; SHARMA, Y. K. Pathogenesis of dermatophytoses. **Indian Journal of Dermatology**, v. 56, n. 3, p. 259, 2011.
- TEY, H. L.; TAN, A. S. L.; CHAN, Y. C. Meta-analysis of randomized, controlled trials comparing griseofulvin and terbinafine in the treatment of *tinea capitis*. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 64, n. 4, p. 663-670, 2011.
- THALLINGER, B.; PRASETYO, E. N.; NYANHONGO, G. S.; GUEBITZ, G. M. Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. **Biotechnology Journal**, v. 8, n. 1, p. 97-109, 2013.
- THOMAS, D. P.; BACHMANN, S. P.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle. **Proteomics**, v. 6, n. 21, p. 5795-5804, 2006.
- TIGGA, R.A.; DAS, S.; BHATTACHARYA, S.N.; SAHA, R.; PANDHI, D.; DATT, S.; RAI, G. Burden of chronic dermatophytosis in a tertiary care hospital: interaction of fungal virulence and host immunity. **Mycopathologia**, v. 183, n. 6, p. 951-959, 2018.
- TORRES-GUERRERO, E.; MARTÍNEZ-HERRERA, E.; ARROYO-CAMARENA, S.; PORRAS, C.; ARENAS, R. *Kerion Celsi*: A report of two cases due to *Microsporum gypseum* and *Trichophyton tonsurans*. **Our Dermatology Online**, v. 6, n. 4, p. 424, 2015.
- TROVATO, L.; OLIVERI, S.; DOMINA, M.; PATAMIA, I.; SCALIA, G.; DE PASQUALE, R. Molecular diagnosis of kerion celsi caused by *Trichophyton tonsurans* in a Italian child. **Medical Mycology Case Reports**, v. 24, p. 72-74, 2019.
- UNNI, J. C.; JOSEPH, R. B. Antifungals in children. **Indian Journal of Practical Pediatrics**, v. 21, n. 1, p. 65, 2019.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

VARGAS-NAVIA, N.; AYALA MONROY, G. A.; FRANCO RÚA, C.; MALAGÓN CAICEDO, J. P.; ROJAS HERNÁNDEZ, J. P. *Tiña Capitis* en niños. **Revista Chilena de Pediatría**, v. 91, n. 5, p. 773-783, 2020.

VEASEY, J. V.; MIGUEL, B. A. F.; BEDRIKOW, R. B. Lâmpada de Wood na dermatologia: aplicações na prática diária. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 9, n. 4, p. 328-330, 2017.

VEASEY, J. V.; MUZY, G. S. C. *Tinea capitis*: correlation of clinical presentations to agents identified in mycological culture. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 93, n. 3, p. 465-466, 2018.

VERMOUT, S.; TABART, J.; BALDO, A.; MATHY, A.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Pathogenesis of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5, p. 267-275, 2008.

VERRIER, J.; MONOD, M. Diagnosis of dermatophytosis using molecular biology. **Mycopathologia**, 182, n. 1-2, p. 193-202, 2017.

VINEETHA, M.; SHEEJA, S.; CELINE, M. I.; SADEEP, M. S.; PALACKAL, S.; SHANIMOLE, P. E.; DAS, S. S. Profile of dermatophytosis in a tertiary care center. **Indian Journal of Dermatology**, v. 63, n. 6, p. 490, 2018.

VINGATARAMIN, Y.; AKHOUNDI, 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. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 4, p. 529-530, 2019.

WANG, X.; DING, C.; XU, Y.; YU, H.; ZHANG, S.; YANG, C. Analysis on the pathogenic fungi in patients with superficial mycosis in the Northeastern China during 10 years. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 20, n. 6, p.1, 2020.

WARYAH, C. B.; WELLS, K.; ULLUWISHEWA, D.; CHEN-TAN, N.; GOGOI-TIWARI, J.; RAVENSDALE, J.; COSTANTINO, P.; GÖKÇEN, A.; VILCINSKAS, A.; WIESNER, J.; MUKKUR, T. *In vitro* antimicrobial efficacy of tobramycin against *Staphylococcus aureus* biofilms in combination with or without DNase I and/or dispersin B: a preliminary investigation. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 3, p. 384-390, 2017.

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. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 2, p. 240-259, 1995.

WINGFIELD, A. B.; FERNANDEZ-OBREGON, A. C.; WIGNALL, F. S.; GREER, D. L. Treatment of *tinea imbricata*: a randomized clinical trial using griseofulvin, terbinafine, itraconazole and fluconazole. **British Journal of Dermatology**, v. 150, n. 1, p. 119-126, 2004.

- WONGSUK, T.; PUMMEESAT, P.; LUPLERTLOP, N. Fungal *quorum sensing* molecules: role in fungal morphogenesis and pathogenicity. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 440-447, 2016.
- WU B.; WANG H.; DAI X.; CHAI X. Influential mechanism of water occurrence states of waste-activated sludge: specifically focusing on the roles of EPS micro-spatial distribution and cation-dominated interfacial properties. **Water Research**, p.117461, 2021.
- WU, C. C.; MACCOSS, M. J.; HOWELL, K. E.; YATES, J. R. A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 532-538, 2003.
- XIE, Z.; THOMPSON, A.; SOBUE, T.; KASHLEVA, H.; XU, H.; VASILAKOS, J.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. *Candida albicans* biofilms do not trigger reactive oxygen species and evade neutrophil killing. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 12, p. 1936-1945, 2012.
- YAMADA, T.; MAEDA, M.; ALSHAHNI, M. M.; TANAKA, R.; YAGUCHI, T.; BONTEMS, O.; SALAMIM, K.; FRATTI, M.; MONOD, M. Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, p. e00115-17, 2017.
- YAMAKAWA, Y.; HAGIWARA, K. I.; NOHTOMI, K.; NAKAMURA, Y.; NISHIJIMA, M.; HIGUCHI, Y.; SATO, Y.; SATA, T.; EXPERT COMMITTEE FOR BSE DIAGNOSIS MINISTRY OF HEALTH, L. A. W. O. J. Observed in an Apparently Healthy 23-Month-Old Holstein Steer. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 56, n. 5/6, p. 221-222, 2003.
- YÁÑEZ, C.; CARVAJAL, L.; VIEILLE, P.; BARRIENTOS, C. Brote de tiña por *Trichophyton tonsurans* en una escuela básica de Valparaíso, Chile. **Revista Chilena De Infectología**, v. 36, n. 4, p. 513-517, 2019.
- YANG, L.; LIU, Y.; WU, H.; SONG, Z.; HØIBY, N.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Combating biofilms. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 146-157, 2012.
- ZALEWSKA-PIĄTEK, B.; PIĄTEK, R. Phage therapy as a novel strategy in the treatment of urinary tract infections caused by *E. coli*. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 304, 2020.
- ZARAA, I.; ZAOUEK, A.; EL EUCH, D.; TROJJET, S.; MOKNI, M.; BEN OSMAN, A. *Tinea capitis* favosa in a 73-year-old immunocompetent Tunisian woman. **Mycoses**, v. 55, n. 5, p. 454-456, 2012.
- ZARESHAHRABADI, Z.; TOTONCHI, A.; REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; ILKIT, M.; GHAHARTARS, M.; ARASTEHFAR, A.; MOTAMEDI, M.; NOURAEI, H.; LARI, M. S.; MOHAMMADI, T. ; ZOMORODIAN, K. Molecular identification and antifungal susceptibility among clinical isolates of dermatophytes in Shiraz, Iran (2017–2019). **Mycoses**, v. 64, n.4, p.385-393, 2020.
- ZARNOWSKI, R.; WESTLER, W. M.; LACMBOUH, G. A.; MARITA, J. M.; BOTHE, J. R.; BERNHARDT, J.; SAHRAOUI, A. L. H.; FONTAINE, J.; SANCHEZ, H.; HATFIELD,

R. D.; NTAMBI, J. M.; NETT, J. E.; MITCHELL, A. P.; ANDES, D. R. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. **MBio**, v. 5, n. 4, 2014.

ZHAN, P.; DUKIK, K.; LI, D.; SUN, J.; STIELOW, J. B.; GERRITS, V. D. E.; BRANKOVICS, B.; MENKEN, S. B. J.; MEI, K.; BAO, W.; LV, G.; LIU, W.; DE HOOG, G. S. Phylogeny of dermatophytes with genomic character evaluation of clinically distinct *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. **Studies in Mycology**, v. 89, p. 153-175, 2018.

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

ZHAO, X.; TANG, X.; GUO, N.; AN, Y.; CHEN, X.; SHI, C.; WANG, C.; LI, Y.; LI, S.; XU, H.; LIU, M.; WANG, Y.; YU, L. Biochanin A enhances the defense against *Salmonella enterica* infection through AMPK/ULK1/mTOR-mediated autophagy and extracellular traps and reversing SPI-1-dependent macrophage (M $\Phi$ ) M2 polarization. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 318, 2018.

ZHOU, Y. B.; CHAO, J. J.; MA, L.; XIAO, Y. Y. Kerion caused by *Trichophyton tonsurans* in an infant. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 102, p. 242-243, 2021.

ZURITA, J.; HAY, R. J. Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes *in vitro*. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 89, n. 5, p. 529-534, 1987.



## APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO

Articles

# *In vitro* and *ex vivo* biofilms of dermatophytes: a new panorama for the study of antifungal drugs

Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco, Lara de Aguiar, Géssica dos Santos Araújo, Raissa Geovanna Pereira Lopes, Jamile de Alencar Sales, Waldemiro Aquino Pereira-Neto, ...show all

Pages 783-791 | Received 22 May 2020, Accepted 11 Aug 2020, Published online: 25 Aug 2020

Download citation <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1811856>

Check for updates

Full Article

Figures & data

References

Citations

Metrics

Reprints & Permissions

Get access



### Abstract

This study describes an *ex vivo* model that creates an environment for dermatophyte biofilm growth, with features that resemble those of *in vivo* conditions, designing a new panorama for the study of antifungal susceptibility. Regarding planktonic susceptibility, MIC ranges were 0.125-1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for griseofulvin and 0.000097-0.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for itraconazole and terbinafine. sMIC50 ranges were 2->512  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for griseofulvin and 0.25->64  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for itraconazole and terbinafine. CLSM images demonstrated a reduction in the amount of cells within the biofilm, but hyphae and conidia were still observed and biofilm biomass was maintained. SEM analysis demonstrated a retraction in the biofilm

### Related research

People also read

Recommended articles

Cited by 6

Ex vivo biofilm-forming ability of dermatophytes using dog and cat hair: an ethically viable approach for an infection model >

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante et al.  
Biofouling

## APÊNDICE B – RESUMO DO ARTIGO SUBMETIDO COM OS DADOS DA DISSERTAÇÃO

### **Inhibitory effect of proteinase K against dermatophytes biofilms: an alternative to increase the terbinafine and griseofulvin antifungal effects**

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante<sup>a</sup>, Raissa Geovanna Pereira Lopes<sup>b</sup>, Lara de Aguiar<sup>d</sup>, Jonathas Sales de Oliveira<sup>a</sup>, Géssica dos Santos Araújo<sup>d</sup>, Germana Costa Paixão<sup>a</sup>, Waldemiro de Aquino Pereira-Neto<sup>a</sup>, Rosemayre Souza Freire<sup>c</sup>, João Victor Serra Nunes<sup>c</sup>, José Júlio Costa Sidrim<sup>\*a</sup>, Marcos Fábio Gadelha Rocha<sup>a,d</sup>.

#### **Abstract**

This study aimed to evaluate the effect of proteinase K on mature biofilms of dermatophytes, by assays of metabolic activity and biomass. In addition, the proteinase K-terbinafine and proteinase K-griseofulvin interactions against these biofilms by the checkerboard assay and scanning electron and confocal microscopy were investigated. The biofilms exposed to 32  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of proteinase K had lower ( $P < 0.0001$ ) metabolic activity and biomass, by 39% and 37.62%, respectively. Drug interactions were synergistic, with proteinase K reducing the minimum inhibitory concentration of antifungals against dermatophyte biofilms at concentration of 32  $\mu\text{g ml}^{-1}$  combined with 128-256  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of terbinafine and griseofulvin. Microscopic images showed a reduction in biofilms exposed to proteinase K, and proteinase K-terbinafine and proteinase K-griseofulvin combinations. These findings demonstrate that proteinase K has activity against biofilms of dermatophytes, and the interactions of proteinase K with terbinafine and griseofulvin improve the activity of drugs against mature dermatophyte biofilms.