

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Avaliação da resistência de *Trichophyton rubrum* ao
antifúngico terbinafina e caracterização fenotípica e genotípica
de fungos dermatófitos.**

Camila Valadas Henriques

Mestrado Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Doutora Raquel Filipa Pinheiro Sabino
Professora Doutora Deodália Maria Antunes Dias

Agradecimentos

Começo por dizer que, a conclusão deste mestrado foi uma grande conquista. Foi o fechar de um ciclo para iniciar outros tantos, igualmente maravilhosos certamente. No entanto, até eu chegar aqui, contei com muitas pessoas que me ajudaram e apoiaram neste percurso tão importante para mim. Quero desta forma, agradecer a todos, que me apoiaram e me deram tanto carinho durante esta “viagem”. Estou muito grata a todos!

Começo por agradecer à Doutora Raquel Sabino, a minha orientadora externa. Não há palavras para descrever o quão grata estou por toda a partilha, todos os ensinamentos, paciência, confiança, carinho, compreensão e amizade. Foi sem dúvida, um privilégio ter aprendido e crescido tanto consigo!

Quero agradecer também à Doutora Cristina Veríssimo, por todo o apoio, incentivo, carinho, compreensão, confiança, partilha e amizade. Foi com muito gosto que tive a oportunidade de aprender, crescer e ter o seu contributo neste trabalho!

À Doutora Helena Simões também por toda a confiança, partilha e aprendizagem. Obrigada por toda a ajuda e simpatia!

Agradeço também à São pelos cafés a meio da manhã no laboratório, pela ajuda, bondade e carinho!

Não posso deixar de agradecer, de certa forma, ao INSA em geral, por sempre me terem feito sentir bem-vinda e por me terem feito sentir parte da equipa. Foi um privilégio ter tido esta oportunidade! Obrigada a todos!

À Professora Deodália Dias por toda a simpatia, ajuda e disponibilidade sempre!

À minha companheira de laboratório Aryse. Quero agradecer-te por toda a paciência, ajuda, companheirismo, amizade e partilha. Foste incansável comigo! Obrigada!

Aos meus colegas de Mestrado, em especial à Stephanie, Jorge, Bárbara, Luís e Matthew pela amizade bonita que criámos. Obrigada pela vossa amizade e apoio!

À minha irmã, não de sangue, mas de coração, Ana Patrícia, por toda a paciência, por todo o carinho, apoio incondicional, gargalhadas, compreensão e ajuda ao longo, não só da tese, mas de todos estes anos de amizade. Foste incansável! Estarei eternamente grata!

À minha melhor amiga Vanessa, por todo o apoio, amizade, carinho e gargalhadas. Obrigada por estes longos anos de amizade incondicional!

Ao meu namorado Ricardo, o homem que sempre me acompanhou, lado a lado, com muita paciência, apoio, amor, carinho e amizade. Obrigada pela cumplicidade e união! Sem dúvida, que foste o meu grande pilar, não só durante a tese, mas durante os 5 anos que estamos juntos! Obrigada de coração pela viagem incrível que tem sido e que continue a ser por muitos bons e longos anos! Amo-te muito!

Por último, mas de forma alguma menos importantes: aos meus pais, porque sem eles nada disto se teria concretizado. Obrigada por todo o vosso amor e dedicação! Amo-vos muito! Aos meus irmãos, por todo o amor, partilha, apoio e gargalhadas. Vocês os quatro são a minha vida! Obrigada!

Resumo

Os dermatófitos são um grupo de fungos filamentosos com uma distribuição cosmopolita, que têm a capacidade de invadir tecidos queratinizados (pele, cabelo e unhas) de humanos e outros animais e provocar uma infecção superficial denominada de dermatofitose. As dermatofitoses são responsáveis por 3 - 4% dos casos de afeções dermatológicas, sendo a infecção superficial mais comum em humanos (com uma prevalência entre os 20-25%). No entanto, espera-se que a sua prevalência continue a aumentar devido ao aparecimento de novos fatores de risco. As espécies do género *Trichophyton* são os principais agentes causadores de patologias como pé de atleta e onicomicose nas mãos e pés e estima-se que afete ~1.000.000.000 de pessoas em todo o mundo. *T. rubrum* e *T. interdigitale* são os principais agentes etiológicos com prevalências de 80% e 20%, respetivamente. Em Portugal, é estimado que 1.510.391 de portugueses sofram de dermatofitoses, correspondendo a uma incidência de 14.300 infecções por dermatófitos por cada 1.000.000 de habitantes. Para o tratamento das dermatofitoses, a primeira terapia a ser prescrita é, na grande maioria dos casos, a terbinafina. Desde 2017 que os casos de resistência a este antifúngico por parte de *T. rubrum* e *T. interdigitale* têm vindo a aumentar gradualmente. Os mecanismos de resistência à terbinafina são, essencialmente, descritos como mutações pontuais no gene que codifica a esqualeno epoxidase.

Assim, neste estudo, procurámos perceber se a problemática de resistência ao antifúngico terbinafina em *T. rubrum* e *T. interdigitale* estaria ou não negligenciada em Portugal. Cento e sessenta e quatro isolados de *T. rubrum* e *T. interdigitale* foram identificados até à espécie através de tecnologias moleculares e também com recurso a espectrometria de massa (MALDI-TOF). De seguida, verificámos a presença da resistência ao antifúngico terbinafina nestes isolados e pesquisámos as mutações associadas a essa mesma resistência. Para tal, procedemos à otimização e implementação de metodologias que permitiram efetuar a avaliação da resistência de isolados de *T. rubrum* e *T. interdigitale*, quer por método cultural quer por metodologias moleculares com sequenciação do gene da esqualeno epoxidase (SQLE) seguida de deteção de mutações neste gene que conferem resistência a este composto.

A caracterização dos padrões de suscetibilidade ao antifúngico terbinafina foi feita recorrendo a meios de *screening* (agar suplementado com terbinafina) e ao método das microdiluições em caldo. Numa primeira abordagem, de 102 isolados de *T. rubrum*, apenas 1 isolado (nº126) revelou ser resistente à terbinafina por meio de *screening* e dos 17 isolados *T. interdigitale*, apenas 3 demonstraram ser resistentes à terbinafina por meio de *screening* em ambas as concentrações utilizadas definidas pela norma EUCAST (0.06 mg/L e 0.125 mg/L). De acordo com a metodologia das microdiluições, 2,44% dos isolados apresentaram menor suscetibilidade à terbinafina. Os nossos resultados demonstram que o isolado nº126 (*T. rubrum*) revelou ser bastante resistente à terbinafina com uma CMI de 8 mg/L, os isolados nº 63 e nº94 (*T. interdigitale*) apresentaram CMIs superiores a 8 mg/L o que representa uma baixa suscetibilidade à terbinafina. O isolado *T. interdigitale* nº 59 apresentou uma CMI igual a 1 mg/L o que revela uma resistência moderada à terbinafina. A otimização da PCR de amplificação e sequenciação do gene da SQLE de *T. rubrum* e *T. interdigitale* permitiu a deteção de mutações pontuais apenas num isolado de cada espécie num total de quatro isolados classificados como resistentes. O isolado *T. rubrum* nº126, após análise da sequência do gene da SQLE, apresentou uma mutação pontual na posição 1189 na ORF do gene da SQLE o que corresponde a uma substituição de uma fenilalanina na posição 397 da sequência de aminoácidos da proteína por uma isoleucina. Apesar de as substituições mais comuns e que levam a uma maior resistência à terbinafina serem L393F e F397L, a substituição F397I detetada no isolado *T. rubrum* deste estudo, sugere causar uma elevada resistência à terbinafina. Relativamente aos isolados resistentes *T. interdigitale*, apenas o isolado nº 94

apresentou uma mutação pontual na posição 1189 na ORF do gene da SQLE, ocorrendo uma substituição de uma fenilalanina na posição 397 da sequência de aminoácidos da proteína por uma leucina, o que confirma a sua CMI superior a 8 mg/L. Nos restantes isolados resistentes pertencentes à espécie *T. interdigitale*, não foram encontradas quaisquer mutações no gene que codifica a SQLE.

Este estudo, permitiu-nos efetuar uma caracterização da população amostrada, das amostras biológicas e dos isolados do género *Trichophyton* obtidos por cultura destas amostras. Foi também possível detetar, pela primeira vez, isolados do género *Trichophyton* resistentes à terbinafina em Portugal. Foi ainda possível estimar, dentro dos isolados estudados, uma frequência de resistência de 2,44%. A resistência à terbinafina por parte de *T. rubrum* e *T. interdigitale* é um problema real em todo o mundo e estima-se que os casos continuem em aumentar e por isso acreditamos que, a aplicação do método de screening e das microdiluições bem como a implementação da reação de PCR para pesquisa de mutações que conferem essa mesma resistência será uma mais valia e um contributo importante no que toca ao diagnóstico e posterior terapia das dermatofitoses reportadas em Portugal.

Palavras-chave: *Trichophyton*; resistência; terbinafina; *T. rubrum*; Portugal

Abstract

Dermatophytes are a group of filamentous fungi with a cosmopolitan distribution, which have the ability to invade keratinized tissues (skin, hair and nails) of humans and other animals and cause a superficial infection called dermatophytosis. Dermatophytosis are responsible for 3 - 4% of cases of dermatological disorders, being the most common superficial infection in humans (with a prevalence of 20-25%). However, it is expected that this prevalence will continue to increase, due to the appearance of new risk factors. Species of the genus *Trichophyton* are the main causative agents of pathologies such as athlete's foot and onychomycosis in the hands and feet and are estimated to affect ~ 1,000,000,000 people worldwide. *T. rubrum* and *T. interdigitale* are the main etiological agents with a prevalence of 80% and 20%, respectively. In Portugal, it is estimated that 1,510,391 of Portuguese suffer from dermatophytosis, corresponding to an incidence of 14,300 infections by dermatophytes per 1,000,000 inhabitants. For the treatment of dermatophytoses, the first therapy to be prescribed is, in the majority of the cases, terbinafine. Since 2017, cases of resistance to this antifungal by *T. rubrum* and *T. interdigitale* have been gradually increasing. The mechanisms of resistance to terbinafine are essentially described as point mutations in the gene encoding squalene epoxidase.

Thus, in this study, we sought to understand whether the problem of resistance to the terbinafine antifungal in *T. rubrum* and *T. interdigitale* would be neglected or not in Portugal. One hundred and sixty-four isolates of *T. rubrum* and *T. interdigitale* were identified up to the species using molecular technologies and also using mass spectrometry (MALDI-TOF). Then, we verified the presence of resistance to the antifungal agent terbinafine in these isolates and investigated the mutations associated with that same resistance. To this end, we proceeded to the optimization and implementation of methodologies that made it possible to evaluate the resistance of *T. rubrum* and *T. interdigitale* isolates, either by cultural method or by molecular methodologies with sequencing of the squalene epoxidase gene (SQLE) followed by detection of mutations in this gene that confer resistance to this compound.

The characterization of the susceptibility patterns to the terbinafine antifungal was performed using agar screening medium (agar supplemented with terbinafine) and the broth microdilution method. In a first approach, of 102 isolates of *T. rubrum*, only one isolate (n° 126) showed to be resistant to terbinafine and of the 17 isolates of *T. interdigitale*, only 3 demonstrated to be resistant to terbinafine by screening agar medium in both concentrations used defined by EUCAST (0.06 mg/L and 0.125 mg/L). According to the microdilution method, 2,44% of the isolates were less susceptible to terbinafine. Our results demonstrate that isolate n° 126 (*T. rubrum*) proved to be quite resistant to terbinafine with a MIC of 8 mg/L, isolates n° 63 and 94 (*T. interdigitale*) had MICs greater than 8 mg/L, which represents a low susceptibility to terbinafine. The isolate *T. interdigitale* n° 59 presented a MIC equal to 1 mg / L, which reveals a moderate resistance to terbinafine. The optimization of the PCR for amplification and sequencing of the SQLE gene of *T. rubrum* and *T. interdigitale* allowed the detection of point mutations in only one isolate of each species in a total of four isolates classified as resistant. The isolate *T. rubrum* n°126, after sequence analysis of the SQLE gene, showed a point mutation at the position 1189 in the ORF of the SQLE gene, which corresponds to a substitution of a phenylalanine at the position 397 of the amino acid sequence of the protein with an isoleucine. Although the most common substitutions that lead to greater resistance to terbinafine are L393F and F397L, the F397I substitution detected in the isolate *T. rubrum* in this study, suggests causing a high resistance to terbinafine. Regarding resistant isolates *T. interdigitale*, only isolate 94 showed a point mutation at position 1189 in the SQLE gene ORF, with a substitution of a phenylalanine at position 397 of the protein's amino acid sequence for a leucine, which confirms the its MIC greater than 8 mg /

L. In the remaining resistant isolates belonging to the species *T. interdigitale*, no mutations were found in the gene encoding SQLE.

This study allowed us to characterize the sampled population, the obtained biological samples and characterize the isolates of the genus *Trichophyton* obtained by culture. It was also possible to detect, for the first time in Portugal, terbinafine resistant isolates belonging to the genus *Trichophyton* to . It was also possible to estimate, within the studied isolates, a resistance frequency of 2.44%. Resistance to terbinafine in *T. rubrum* and *T. interdigitale* is a real problem worldwide and it is estimated that cases continue to increase and that is why we believe that the application of the screening method and microdilutions, as well as the implementation of the PCR reaction to search for mutations that confer this same resistance will be an important contribution with regard to the diagnosis and subsequent therapy of the dermatophytosis reported in Portugal.

Keywords: *Trichophyton*; resistance; terbinafine; *T. rubrum*; Portugal

Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo	V
Abstract	VII
Índice	X
Índice de figuras	XI
Índice de tabelas	XII
Índice de figuras suplementares	XIII
Índice de tabelas suplementares	XIII
Lista de Abreviaturas	XIV
1 Introdução	1
1.1 Características gerais dos fungos.....	1
1.2 Infecções fúngicas	1
1.2.1 Tipos de infecção e mecanismos de transmissão	1
1.2.2 Impacto e epidemiologia das infecções fúngicas	2
1.3 Dermatófitos.....	3
1.3.1 Género <i>Trichophyton</i>	4
1.3.1.1 <i>Trichophyton rubrum</i>	8
1.3.1.2 Interação dermatófito-hospedeiro e patogénese das dermatofitoses associadas a <i>T. rubrum</i> 9	
1.3.1.3 Patologias frequentemente associadas a infecções provocadas por <i>T. rubrum</i>	11
1.3.1.3.1 Tinea pedis.....	11
1.3.1.3.2 Onicomicose	12
1.3.1.4 Epidemiologia das dermatofitoses provocadas por <i>T. rubrum</i>	13
1.3.2 Tratamento.....	13
1.3.3 A problemática da resistência aos antifúngicos	15
1.3.3.1 Mecanismos de resistência de <i>T. rubrum</i> ao antifúngico terbinafina	15
2 Objetivos	19
3 Materiais e Métodos	20
3.1 Amostras biológicas	20
3.1.1 Colheitas e procedimento cultural	20
3.2 Caracterização dos isolados de <i>Trichophyton</i>	21
3.3 Testes de suscetibilidade ao antifúngico	24
3.3.1 Preparação do antifúngico terbinafina para os meios de <i>screening</i> agar suplementados...24	
3.3.2 Pesquisa de isolados de <i>T. rubrum</i> e <i>T. interdigitale</i> resistentes à terbinafina por meio de <i>screening</i>	24
3.3.3 Determinação da suscetibilidade à terbinafina pelo método de microdiluição em placa...24	
3.4 Amplificação e sequenciação do gene da SQLE para pesquisa de mutações que confirmam resistência à terbinafina em <i>T. rubrum</i> e <i>T. interdigitale</i>	25
3.5 Pesquisa de mutações no gene SQLE	26
3.6 Análise estatística	26

4	Resultados	27
4.1	Caracterização da população amostrada	27
4.2	Caracterização dos isolados de <i>Trichophyton</i> através da técnica de PCR e MALDI-TOF.....	28
4.3	Filogenia dos isolados <i>T. rubrum</i> e <i>T. interdigitale</i> estudados.....	29
4.4	Testes de suscetibilidade à terbinafina.....	31
4.4.1	Pesquisa de isolados <i>T. rubrum</i> e <i>T. interdigitale</i> resistentes à terbinafina por meios <i>screening</i> de agar suplementado com terbinafina	31
4.4.2	Determinação da suscetibilidade à terbinafina pelo método de microdiluição em placa.....	32
4.5	Otimização e implementação da técnica PCR para amplificação e sequenciação do gene da SQLE para pesquisa de mutações que conferem resistência à terbinafina em <i>T. rubrum</i> e <i>T. interdigitale</i>	34
4.6	Mutações pontuais detetadas no gene SQLE de isolados resistentes à terbinafina.....	36
5	Discussão de Resultados.....	37
6	Conclusões e Perspetivas Futuras	41
7	Bibliografia	42
8	Material Suplementar	46

Índice de figuras

Figura 1.1	- Árvore filogenética de máxima verossimilhança construída com base na sequenciação da região ITS, TUB, LSU parcial e da proteína ribossomal 60S L10 das espécies do género <i>Trichophyton</i> . Adaptado de Hoog et al., (2016) ¹⁸	6
Figura 1.2	- Mapa da distribuição mundial das várias espécies do grupo dos dermatófitos. Pode-se comprovar que <i>T. rubrum</i> é uma espécie cosmopolita e que, nos dias de hoje, a sua distribuição será ainda mais vasta ³¹	7
Figura 1.3	- Morfologia de uma cultura da espécie fúngica <i>T. rubrum</i> ³²	8
Figura 1.4	- Dependendo do meio em que a estirpe é inoculada, esta pode produzir diferentes colorações. No caso de <i>T. rubrum</i> , esta espécie produz pigmentos vermelhos e amarelos, consoante o meio utilizado ³²	8
Figura 1.5	- Esquematização do mecanismo de infeção da epiderme pelo dermatófito antropofílico <i>T. rubrum</i>	9
Figura 1.6	- Tinea pedis, causada por <i>T. rubrum</i> onde é visível a descamação da pele entre os dedos. Créditos: Geraldine Kaminski Library #309 and Drs G. Donald and D. Hill, Adelaide, S.A ³⁸	11
Figura 1.7	- Onicomicose causada por <i>T. rubrum</i> ³¹	12
Figura 1.8	- Via de síntese do ergosterol ⁴⁴	14
Figura 1.9	- Mecanismos de resistência à terbinafina em dermatófitos. Adaptado de Khurana, A., Sardana, K. e Chowdhary, A., (2019) ⁴⁸	16
Figura 1.10	- Representação da estrutura em 3D da proteína wild-type e da proteína mutante a verde e a vermelho, respetivamente. A mudança dos aminoácidos de fenilalanina para leucina (F397L) distorce a estrutura da proteína ⁴⁹	18

Figura 1.11 - Alinhamento da sequência de aminoácidos de um domínio altamente conservado da esqualeno epoxidase de <i>T. rubrum</i> com membros da família da SQLE fúngica, onde as substituições de aminoácidos afetam a suscetibilidade à terbinafina ⁷	18
Figura 3.1 – Representação da tecnologia MALDI-TOF. Adaptado de Patel, R., (2015) ⁶¹	21
Figura 4.1 - - Representação gráfica das várias faixas etárias encontradas nos 164 isolados de <i>T. rubrum</i> e <i>T. interdigitale</i>	27
Figura 4.2 – Representação gráfica dos tipos de amostra biológica mais frequentemente recebidos no laboratório com presença de dermatofitose.	28
Figura 4.3 - Árvore filogenética obtida por Neighbor-Joining a partir das sequências do gene da calmodulina.....	29
Figura 4.4 - Árvore filogenética obtida por Neighbor-Joining a partir das sequências da região ITS..	30
Figura 4.5 - Resultado do screening para o isolado <i>T. rubrum</i> N° 126.	31
Figura 4.6 - Resultados dos screenings realizados aos isolados <i>T. interdigitale</i>	32
Figura 4.7 - Resultado da eletroforese em gel de agarose do produto da primeira PCR para amplificação do gene da SQLE com os primers F1 e R1.....	34
Figura 4.8 - Resultado da eletroforese em gel de agarose do produto da última PCR para amplificação do gene da SQLE com os primers Drsq1 e Drsq2.	35
Figura 4.9 - Alinhamento da sequência de DNA do gene da SQLE fúngica do isolado resistente <i>T. rubrum</i> n°126 e de um isolado sensível <i>T. rubrum</i> n° 143 com as sequências de referência sensível e resistente do GenBank MG587093.2 e AY282412.1, respetivamente.....	36
Figura 4.10 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína SQLE fúngica do isolado resistente <i>T. rubrum</i> n°126 e de um isolado sensível <i>T. rubrum</i> n° 143 com as sequências de referência sensível e resistente do GenBank MG587093.2 e AY282412.1, respetivamente	36
Figura 4.11 - Alinhamento da sequência de DNA do gene da SQLE fúngica do isolado resistente <i>T. interdigitale</i> n° 94 e de três isolados sensíveis <i>T. interdigitale</i> (n° 41, 49 e 65) com uma sequência de referência resistente e sensível do GenBank MH114933.1 e MG587085.2, respetivamente.	36
Figura 4.12 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína SQLE fúngica do isolado resistente <i>T. interdigitale</i> n° 94 e de três isolados sensíveis <i>T. interdigitale</i> (n° 41, 49 e 65) com uma sequência de referência resistente e sensível do GenBank MH114933.1 e MG587085.2, respetivamente.	37

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Características fenotípicas e genotípicas dos isolados clínicos de pacientes com infecções provocadas por dermatófitos. Adaptado de Yamada et al., (2017) ⁴⁰	17
Tabela 3.1 - Primers utilizados na caracterização molecular das espécies positivas para dermatófitos.	22
Tabela 3.2 - Condições de PCR utilizadas na amplificação da região ITS.	23
Tabela 3.3 -Condições de PCR utilizadas na amplificação do gene da calmodulina.	23
Tabela 3.4 -Condições de PCR utilizadas para a sequenciação da região ITS e do gene da calmodulina.....	24
Tabela 3.5 - Primers utilizados na amplificação e sequenciação do gene da SQLE presentes em <i>T. rubrum</i> e <i>T. interdigitale</i>	25
Tabela 3.6 - Condições de PCR utilizadas para a sequenciação do gene da SQLE para cada par de primers.	26

Tabela 4.1 - Suscetibilidade ao antifúngico terbinafina dos isolados <i>T. rubrum</i> e <i>T. interdigitale</i> determinada através de microdiluição em caldo.	32
Tabela 4.2 - Otimização das condições de PCR para amplificação do gene <i>SQLE</i> com os primers F1 e R1.....	34
Tabela 4.3 - Otimização das condições de PCR para amplificação do gene <i>SQLE</i> com os primers Drsq1 e Drsq2.	35

Índice de figuras suplementares

Figura Suplementar 1 - Esquema da metodologia de preparação dos meios com antifúngico.	47
Figura Suplementar 2 - Esquema da metodologia dos meios de screening em agar suplementado com terbinafina em cada um dos isolados estudados.....	47
Figura Suplementar 3 - Esquema da metodologia da determinação das CMI's por microdiluição em placa.	47

Índice de tabelas suplementares

Tabela Suplementar 1 - Características clínicas gerais dos 164 isolados clínicos com dermatofitose.	46
---	----

Lista de Abreviaturas

- CHCA** *α -cyano-4-hydrocinnamic acid*
- CLSI** *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CMD** Calmodulina
- CMI** Concentração mínima inibitória
- DMSO** Dimetilsulfóxido
- EUCAST** *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- HLA** *Human leukocyte antigen*
- ITS** *Internal transcribed spacer*
- KOH** Hidróxido de Potássio
- LSU** *Large subunit*
- MALDI-TOF** *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight*
- McF** *McFarland*
- MEGA** *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*
- ORF** *Open Reading Frame*
- PCR** *Polymerase Chain Reaction*
- RRP** Recetores de Reconhecimento de Padrões
- SDA** *Sabouraud dextrose agar*
- SIDA** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- SPSS** *Statistical Package for the Social Sciences*
- SQLE** Esqualeno Epoxidase
- TLR** *Toll-like receptors*
- UFC** Unidades Formadoras de Colónias
- VIH** Vírus da Imunodeficiência Humana
- TRB** Terbinafina

1 Introdução

1.1 Características gerais dos fungos

À semelhança dos animais e das plantas, os fungos são organismos eucariotas, pertencentes ao reino *Fungi*, constituindo um grupo de organismos bastante diversificado do qual fazem parte os fungos filamentosos (bolores) e as leveduras. Este conjunto de organismos é considerado, o segundo grupo de organismos mais rico em espécies, posteriormente aos insetos, com uma estimativa de 1.5 milhões de espécies existentes no entanto, com apenas 120.000 espécies descritas ¹⁻³.

Os fungos caracterizam-se por serem organismos quimioorganotróficos, sendo na sua maioria multicelulares, e por desenvolverem filamentos – hifas – e estruturas de reprodução assexuada a partir dos quais são produzidos os esporos - conídios. Conseguem reproduzir-se através de reprodução sexuada ou reprodução assexuada (mais frequente). A parede celular fúngica é composta por quitina ou por outros polissacáridos, como por exemplo, os mananos e a sua membrana plasmática tem como componente fundamental e diferenciador, o ergosterol ¹.

Os fungos desempenham vários papéis nos ecossistemas, estabelecendo diversos tipos de relações bióticas tais como: mutualismo, parasitismo, comensalismo, sendo que a maioria dos fungos são saprófitas, sendo responsáveis pela decomposição da matéria orgânica através da libertação de enzimas e tendo por isso uma grande importância a nível dos ecossistemas ^{1,2}.

1.2 Infecções fúngicas

1.2.1 Tipos de infeção e mecanismos de transmissão

Os fungos são organismos abundantes e essenciais para o ambiente e apenas uma pequena parte é efetivamente patogénica ⁴. Os fungos são capazes de provocar diversos tipos de doenças em humanos, sendo umas menos graves e incapacitantes que outras ¹. Apenas 300 ^{5,6}, da estimativa de 1.5 milhões de espécies fúngicas, causam efetivamente doenças em humanos e a incidência de cada tipo de infeção varia consoante certos fatores como, condições socioeconómicas, regiões geográficas, envelhecimento da população, embora a incidência de infeções fúngicas sistémicas e oportunistas seja mais elevada em indivíduos imunocomprometidos, como por exemplo, indivíduos com infeção pelo vírus VIH/SIDA, indivíduos sujeitos a terapias imunossupressoras (como quimioterapia), bem como indivíduos sujeitos a transplante de órgãos ou com tuberculose (ativa ou com sequelas da mesma). O uso indiscriminado de antibióticos também pode contribuir para o agravamento da situação, facilitando uma colonização fúngica e subsequentemente infeção, situação cada vez mais frequente ^{7,8}. Dependendo do local da infeção, as infeções fúngicas podem ser classificadas como: superficiais, subcutâneas e sistémicas.

As infeções superficiais são causadas principalmente por fungos dermatófitos, os agentes fúngicos mais frequentemente isolados em todo o mundo e o principal foco desta dissertação; estes são responsáveis pela infeção restrita do tecido queratinizado do estrato cornificado ^{9,10}. Dentro das infeções superficiais, existem ainda as infeções das mucosas orais e genitais causadas por diversas espécies pertencentes ao género *Candida*, agente etiológico mais comum deste tipo de infeções fúngicas. A espécie *C. albicans* é o principal agente responsável por infeções fúngicas nas mucosas como a candidíase vaginal/vulvovaginal. As infeções superficiais podem ser transmitidas através de contacto direto com animais, superfícies ou objetos contaminados ou, especificamente no caso das infeções das mucosas, ocorrem por desregulação da flora endógena e afetam tanto pessoas imunocompetentes como pessoas imunodeprimidas ⁸. As infeções fúngicas subcutâneas são infeções nas camadas mais internas da pele, resultantes da inoculação subcutânea de um agente exógeno. A disseminação deste tipo de infeção é rara, existindo apenas uma propagação no tecido circundante, ou eventualmente alguma disseminação pelo sistema linfático. No entanto, quando acontece a disseminação deste tipo de infeção, o tratamento com antifúngico oral deverá ser feito o quanto antes

pois, a destruição do tecido pode ser grave. Esporotricose (causada por *Sporothrix spp.*) ou cromoblastomicose (causada por diversas espécies de fungos dermatíceos como por exemplo, *Cladophialora spp.*, *Fonsecaea spp.* ou *Phialophora verrucosa*) são exemplos de infecções fúngicas subcutâneas ^{1,11}.

Por último, temos as infecções fúngicas invasivas (ou sistêmicas) que são as mais graves das três. São contraídas por transmissão endógena ou exógena (no caso das leveduras) ou por inalação dos esporos que vão desenvolver hifas e dar origem a uma infecção pulmonar e, por disseminação através da corrente sanguínea, também podem acabar por se alojar noutros órgãos e provocar uma infecção. Este tipo de infecção atinge principalmente, indivíduos imunocomprometidos e os principais agentes patogénicos são espécies pertencentes aos géneros *Aspergillus*, *Cryptococcus* e *Candida* ^{1,8,12}.

Outro fungo patogénico oportunista capaz de provocar patologias respiratórias é a espécie *Pneumocystis jirovecii*. Em indivíduos imunocompetentes, esta espécie não se comporta como um verdadeiro agente patogénico, no entanto, em indivíduos portadores de VIH/SIDA, indivíduos com malignidades hematológicas, pacientes transplantados ou pacientes que estejam a realizar terapia imunossupressora prolongada, quando infetados com esta espécie podem desenvolver pneumonia. A transmissão ocorre via aerossol a partir de pacientes com pneumonia provocada por *Pneumocystis jirovecii* ou por contacto com pessoas que sejam portadoras do fungo nos pulmões, mesmo até durante a infância ^{8,13}.

Para além dos fungos filamentosos e leveduras, que são os agentes patogénicos oportunistas mais comuns, também existem os fungos dimórficos que são organismos que conseguem ter as duas morfologias (filamentosos a 25°C e leveduriformes a 37°C), sendo considerados como fungos verdadeiramente patogénicos, dado que a forma leveduriforme, por ser unicelular, é disseminada mais facilmente através da corrente sanguínea ¹.

Fungos dimórficos tais como *Histoplasma spp.*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Sporothrix schenckii* são capazes de provocar infecções graves, existindo algumas regiões endémicas ¹.

1.2.2 Impacto e epidemiologia das infecções fúngicas

É amplamente conhecido o impacto ecológico que os fungos têm na extinção de espécies, na perturbação dos ecossistemas e ainda na segurança alimentar ^{4,8,14}. Para além disso, quando falamos em saúde humana, as infecções fúngicas são responsáveis por cerca de 1.5 milhões de mortes em todo o mundo e estima-se que afetem mais de mil milhões de pessoas ¹².

As infecções fúngicas invasivas têm uma incidência muito menor que as infecções fúngicas superficiais, no entanto, estão associadas a taxas de mortalidade muito superiores (entre os 30-80%) ^{4,8,12} quando em comparação com as infecções superficiais. Globalmente, é estimado que ocorram mais de 300.000 casos de aspergilose invasiva provocada por espécies do género *Aspergillus*, principalmente pelas espécies da secção *Fumigati* e secção *Flavi*. Em Portugal, a prevalência das infecções provocadas por *Aspergillus spp.* têm vindo a aumentar e estima-se que todos os anos, causem entre 2.3-159 dos casos por cada 100.000 habitantes. A pneumonia provocada do *Pneumocystis jirovecii* também conta com uma prevalência estimada muito elevada, com 400.000 casos anualmente por todo o globo, porém, acredita-se que esteja subestimada. Estima-se que anualmente a incidência da pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii* seja de 0.62 por cada 100.000 habitantes em Portugal ¹⁵.

A meningite criptocócica causada por *Cryptococcus neoformans* afeta mais severamente indivíduos imunocomprometidos e estima-se que afete ≈ 278.250 pessoas todos os anos em todo o mundo, sendo mais comum em países tropicais como o Brasil, Tailândia, Malásia e também no continente africano, não pela sua endemicidade, mas pelo facto de nestes países a prevalência de VIH ser muito elevada e a

criptococose é uma infecção oportunista deste grupo de doentes ¹⁶. Em Portugal estima-se que a incidência da meningite criptocócica anualmente seja de 0.12 por cada 100.000 habitantes ¹⁵.

Em relação às infecções crónicas severas, estas também são um problema global em certas zonas endémicas. *Histoplasma capsulatum* é responsável por ≈25.000 casos de histoplasmose todos os anos, em todo o mundo ¹². Para além de ser endémico dos EUA, *H. capsulatum* também é endémico da América do Sul e Central, Índia e do continente africano. A sua taxa de mortalidade está entre os 28-50%. Em Portugal, estima-se que cerca de 491.780 habitantes portugueses que viajaram para o continente americano e para o continente africano, possam estar infetados com *H. capsulatum* uma vez que, Portugal recebe muitas pessoas da América do Sul, principalmente do Brasil e também de Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa (PALOP) ¹⁵.

Outro fungo responsável por causar infecção crónica nos pulmões ou noutros órgãos como a pele ou mucosas é o *Paracoccidioides brasiliensis* que é endémico de toda a América Latina, principalmente do Brasil e todos os anos provoca ≈ 4.000 casos no Brasil e apresenta uma taxa de mortalidade entre os 5-27%. Em território nacional, pensa-se que a sua prevalência seja também superior à esperada ¹⁷.

No que respeita às infecções superficiais, as infecções das mucosas do trato oral e do trato genital também são bastante comuns, principalmente a candidíase vaginal provocada pela espécie *C. albicans*, que chega a atingir cerca de 50-75% das mulheres⁸ que corresponde a ≈134.000.000 infecções anualmente ¹². As infecções fúngicas superficiais de tecidos queratinizados são as que apresentam maior prevalência e estima-se que afetem aproximadamente mil milhões da população mundial (≈25%), sendo provocadas principalmente por dermatófitos cujas patologias associadas, mais comuns, são o pé de atleta, onicomicose e a infecção do couro cabeludo ^{8,12}.

1.3 Dermatófitos

Os dermatófitos são um grupo de fungos filamentosos com uma distribuição cosmopolita, que têm a capacidade de invadir tecidos queratinizados (pele, cabelo e unhas) de humanos e outros animais e provocar uma infecção superficial denominada de dermatofitose ^{10,18-20}.

De acordo com a mais recente taxonomia baseada em metodologias moleculares, existem sete géneros de dermatófitos, sendo os mais comuns *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* ^{21,22}. Todos os dermatófitos pertencem à família *Arthrodermataceae* ⁹ e, conforme o seu habitat natural, a especificidade do hospedeiro e meio de transmissão, podem ser classificados em três grupos ecológicos: antropofílicos, zoofílicos e geofílicos ^{18,21}. As espécies antropofílicas caracterizam-se por se transmitirem de humanos para humanos, sendo por isso o Homem o seu hospedeiro preferencial, e por gerarem uma infecção não inflamatória, ligeira e crónica, chegando a atingir proporções epidémicas. As espécies zoofílicas, por sua vez, são espécies que vivem em maior associação com animais do que com humanos embora ocasionalmente também possam provocar infecções nos humanos por exemplo através do contacto com pêlos de animais. Por serem provavelmente menos adaptadas ao ser humano, as espécies zoofílicas originam infecções com respostas inflamatórias mais severas do que as infecções provocadas por espécies antropofílicas ²³. Por último, as espécies geofílicas são espécies que sobrevivem num ambiente onde exista material queratinizado em decomposição no solo, como por exemplo penas, cascos, chifres, pêlo, e as infecções provocadas por estas espécies são altamente inflamatórias no Homem, contudo de tratamento rápido ^{9,18,19,21}.

As dermatofitoses podem ser classificadas de acordo com o local de infecção: *tinea capitis* (infecção do couro cabeludo), *tinea pedis* (infecção nos pés, comumente conhecida como “pé de atleta”), *tinea cruris* (infecção na zona da virilha), *tinea manum* (infecção nas mãos), *tinea corporis* (infecção da pele glabra do corpo), *tinea barbae* (infecção na face, associada ao pêlo da barba) e *tinea unguium* ou onicomicose (infecção das unhas). Os sinais clínicos mais comuns da degradação da queratina nos tecidos causada pela ação dos fungos bem como pelas respostas imunes específicas do hospedeiro, envolvem secura,

descamação, fissuras e eritema na pele dos pés, couro cabeludo ou outros locais do corpo. Quando os dermatófitos infetam humanos, estes colonizam a superfície mais externa da pele queratinizada e normalmente não invadem o tecido vivo. Contudo, ao contrário do que se pensa, em pacientes com infecção crônica, pode haver invasão da epiderme, de tecidos subcutâneos e até mesmo de órgãos internos, em indivíduos imunodeprimidos, e representar uma ameaça à saúde caso não seja realizado um tratamento adequado^{19,23}. De acordo com vários estudos, estão descritas várias mutações que se traduzem numa maior suscetibilidade genética do hospedeiro à infecção por dermatófitos, que torna possível que os dermatófitos invadam a derme, sobrevivam e se dispersem até aos nódulos linfáticos e órgãos internos. São vários os fatores responsáveis por provocar uma dermatofitose severa como por exemplo, alguns haplótipos do sistema HLA (aumentam ou diminuem o risco de dermatofitose), mutações no gene *CLEC7A* que é responsável pela codificação da proteína dectina-1 que se liga aos β -glucanos da parede fúngica e até mesmo mutações em vias de sinalização envolvidas em respostas imunes antifúngicas como a *CARD9*^{19,23}.

Para além da membrana celular, os fungos são compostos também por uma parede celular que é responsável por conferir resistência mecânica, estrutura celular e rigidez. Para além disso, a parede celular desempenha um papel crucial na adesão dos dermatófitos aos tecidos do hospedeiro, que será detalhada nos subcapítulos mais adiante²³.

As paredes celulares dos dermatófitos são compostas por polissacáridos entre os quais β -glucanos, mananos e galactomananos sendo que estes componentes são variáveis entre espécies. Através de gemulação lateral ou terminal das hifas ou da sua fragmentação no local dos septos, as hifas são capazes de produzir dois tipos de esporos – conídios ou arthroconídios, respetivamente. Como já é compreendido, os esporos são estruturas unicelulares com baixa atividade metabólica que são fisiologicamente designados para dispersarem no ambiente e para sobreviverem em condições adversas, só se tornando ativos quando essas condições se tornam favoráveis. No caso dos dermatófitos essas condições tornam-se favoráveis a partir do momento em que os arthroconídios aderem aos tecidos adequados de um hospedeiro compatível²³.

Para a cultura destes fungos, os micologistas optam pela utilização de dois meios preferenciais: o meio Sabouraud dextrose agar (SDA) suplementado com cloranfenicol para inibir o crescimento bacteriano e o agar micobiótico (Mycosel Agar) suplementado também com cloranfenicol e com cicloheximida que inibe, não só o crescimento de fungos saprófitas (*Penicillium* spp., *Alternaria* spp. e *Curvularia* spp. que são as espécies contaminantes mais frequentes) e de fungos filamentosos (como *Aspergillus* spp., e *Fusarium* spp. que podem ser espécies contaminantes ou agentes etiológicos da onicomiose) que se desenvolvem entre 3 a 5 dias, mas também de certas leveduras (que se desenvolvem entre 24h a 48h), sem inibir o crescimento dos dermatófitos. Para que seja possível o crescimento e a identificação de dermatófitos são necessárias 2 a 3 semanas, daí que um meio de cultura com cicloheximida seja um meio comumente utilizado nos laboratórios de micologia médica para deteção de dermatófitos²⁴.

1.3.1 Género *Trichophyton*

De acordo com a aplicação de novas ferramentas moleculares, a filogenia dos dermatófitos foi reestruturada em 2017. Assim, em vez dos clássicos três géneros de dermatófitos (*Microsporum*, *Epidermophyton*, *Trichophyton*) foram descritas sete clades diferentes, correspondentes a sete géneros (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Paraphyton*, *Lophophyton*, *Nannizia*, *Microsporum*, *Arthroderma*)²¹. O género *Trichophyton* pertence à família Arthrodermataceae, filo Ascomycota, reino Fungi; caracterizam-se por serem fungos filamentosos capazes de degradar queratina de tecidos queratinizados como pele, unhas e cabelo^{18,21}.

O género é composto por 16 espécies - *T. concentricum*, *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. schoenleinii*, *T. soudanense*, *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. benhamiae*, *T. bullosum*, *T. equinum*, *T. eriotrephon*, *T. erinacei*, *T. quinckeanum*, *T. simii* e *T. verrucosum* - que causam grande

impacto socioeconómico ^{9,21,22}. Apesar de a nível molecular serem bastante semelhantes, este género é dividido em 4 complexos: complexo *T. benhamiae*, complexo *T. bullosum*, complexo *T. mentagrophytes* e complexo *T. rubrum*. Destes dois últimos fazem parte os dermatófitos mais comuns em casos clínicos (**Figura 1.1**) ^{21,25}.

Fazem parte do complexo *T. rubrum*, organismos distintos fenotipicamente com diferentes características clínicas, morfológicas, fisiológicas e culturais, as espécies *T. violaceum*, *T. rubrum* e *T. soudanense* que foram descritas em 1902, 1910 e entre 1960-1990, respetivamente ²⁶.

A identificação molecular dos dermatófitos baseia-se na sequenciação da região *Intergenic Transcribed Spacer* (ITS) por ser uma região altamente conservada em vários microrganismos ^{22,27}. No entanto, outros locus têm sido usados para efetuar a identificação de um isolado ao nível da espécie de forma precisa (distinguindo espécies do mesmo complexo), nomeadamente os genes que codificam a **β -tubulina** onde num estudo realizado por Rezaei-Matehkolaei et al.²⁸, a árvore filogenética construída através da sequenciação do gene da β -tubulina de 54 dermatófitos demonstrou ser muito semelhante à árvore filogenética construída através da sequenciação da região ITS para 31 dermatófitos sendo por isso considerado um gene taxonomicamente valioso para a identificação de dermatófitos, a **calmodulina** em que num estudo realizado por Ahmadi et al.²⁰, a topologia da árvore filogenética do gene da calmodulina demonstrou, para a maioria das espécies de dermatófitos estudada, uma congruência com regiões codificantes e não codificantes incluído a região ITS, β -tubulina e para o fator de alongamento da tradução 1- α (Tef-1 α), a **proteína ribossomal 60S L10** que a seguir à região ITS e à β -tubulina, demonstrou valores *bootstrap* superiores a 80% com a distinção de 32 *clades* no estudo conduzido por Hoog et al.²¹, e o **fator de alongamento da tradução 1- α (Tef-1 α)** onde o seu elevado poder discriminatório em algumas espécies, incluindo *T. rubrum*, demonstrou ser particularmente útil na sua identificação ²⁹.

Apesar de existirem diversos genes que podem ser úteis na identificação de dermatófitos até ao nível da espécie, não deve ser feita uma avaliação em separado ou recorrendo apenas a um único gene, de maneira a garantir uma identificação molecular elevada e precisa e minimizar os erros a nível de taxonomia.

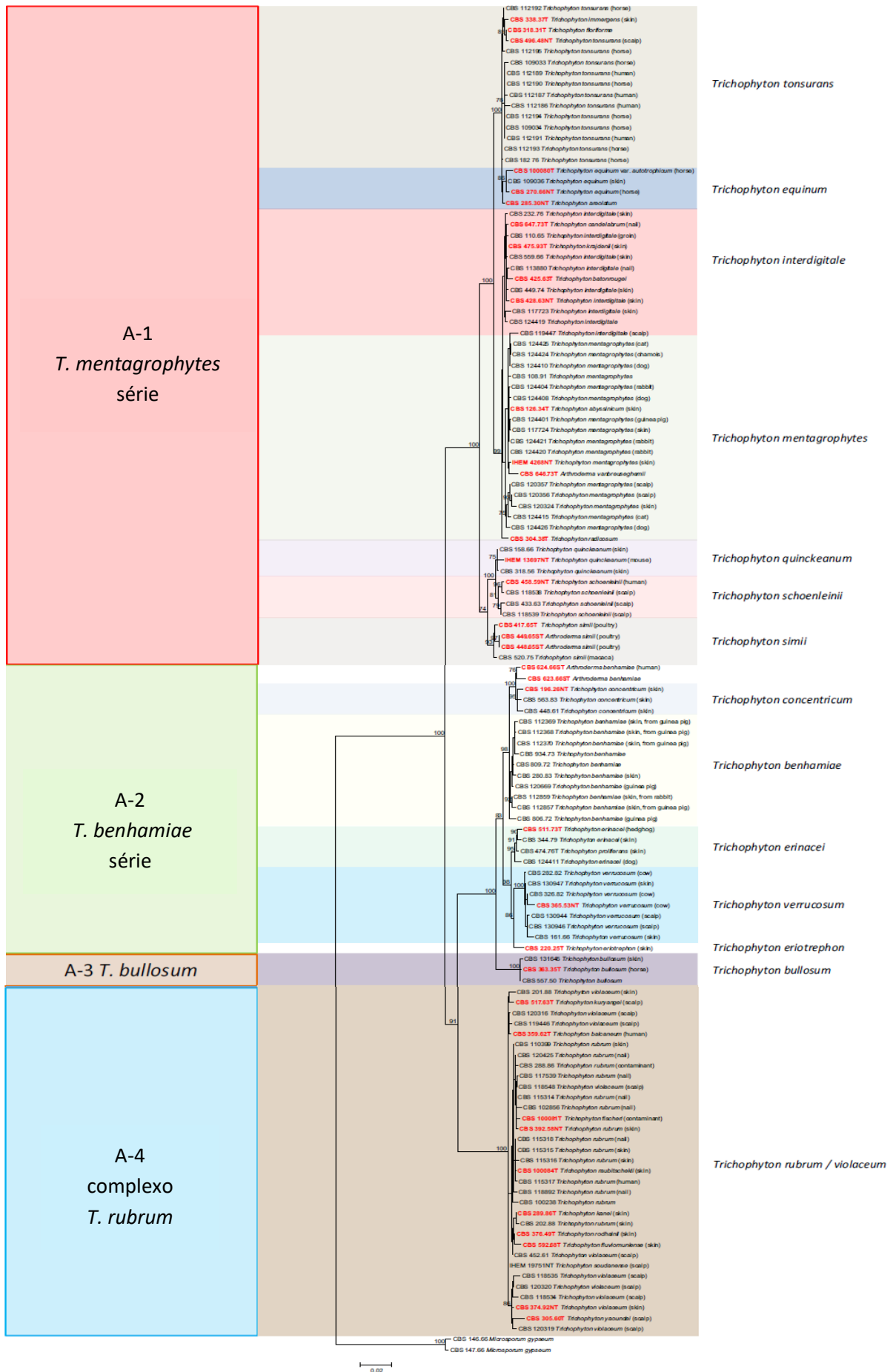


Figura 1.1 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança construída com base na sequenciação da região ITS, TUB, LSU parcial e da proteína ribossomal 60S L10 das espécies do gênero *Trichophyton*. Adaptado de Hoog et al., (2016) ¹⁸.

Estas espécies têm uma distribuição mundial, porém, umas espécies são mais endêmicas de certas regiões do que outras como é o caso de *T. soudanense* e *T. violaceum* que são predominantes de zonas climáticas áridas como África, China Ocidental e Médio Oriente, enquanto *T. rubrum* é mais predominante na Europa, América do Norte e Central, Ásia e também Médio Oriente ^{10,18,21,22,30} (**Figura 1.2** ³¹).

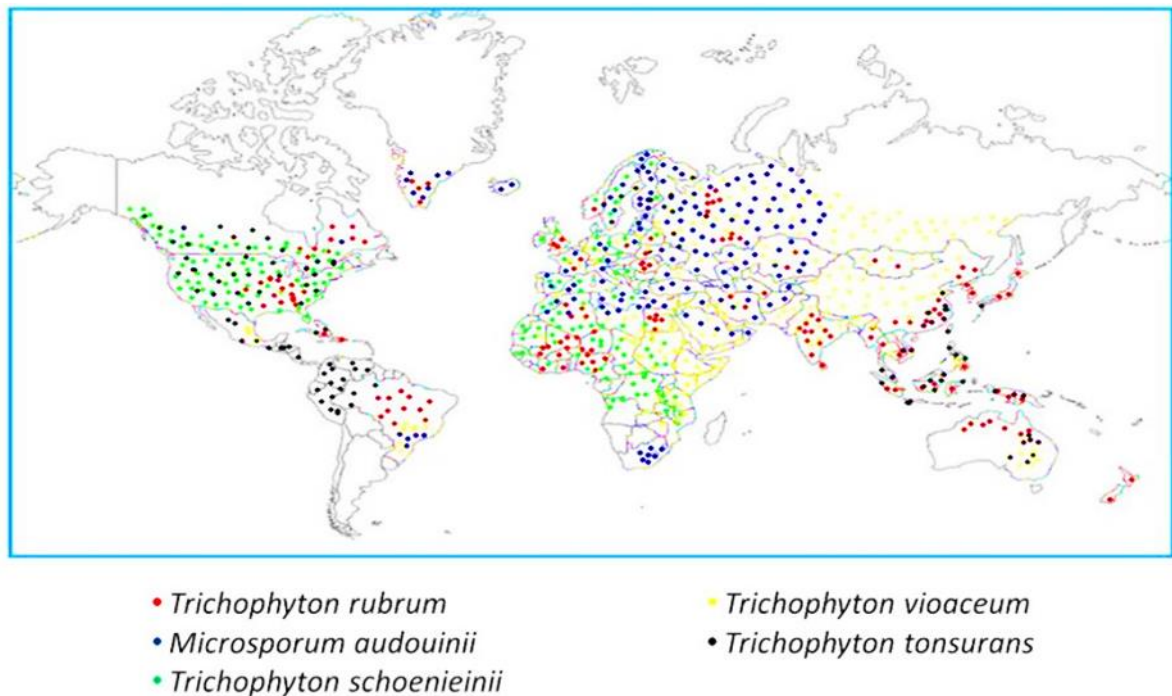


Figura 1.2 - Mapa da distribuição mundial das várias espécies do grupo dos dermatófitos. Pode-se comprovar que *T. rubrum* é uma espécie cosmopolita e que, nos dias de hoje, a sua distribuição será ainda mais vasta ³¹.

Quando em cultura, as colónias deste género são maioritariamente algodoadas, em tons de brancos a amarelados, e o reverso das colónias pode apresentar colorações cremes, acastanhadas, vermelhas e violetas, sendo estas características variáveis de espécie para espécie e de meio para meio. As hifas são caracterizadas por possuírem paredes finas e por não apresentarem qualquer coloração (hifas hialinas). O género *Trichophyton* é caracterizado morfológicamente pelo desenvolvimento de macro e microconídios. Os macroconídios, quando presentes, são geralmente suportados diretamente nas hifas, e são de paredes maioritariamente finas e lisas, em forma de “taco” mais largo na ponta ou fusiformes. Já os microconídios são mais pequenos e podem assumir várias formas ³².

No momento da identificação da espécie, há que ter em conta vários aspetos como a forma, tamanho e disposição dos microconídios (bem como dos macroconídios), a existências de outras estruturas fúngicas ou hifas diferenciadas, as características morfológicas das colónias bem como, o histórico clínico do utente, isto é, se esteve em contacto com animais, a sua ocupação, localização geográfica e histórico de viagens de forma a que seja possível identificar a espécie em causa e assim garantir um diagnóstico diferencial ³².

1.3.1.1 *Trichophyton rubrum*

T. rubrum é o dermatófito antropofílico mais amplamente distribuído pelos seres humanos, inicialmente isolado em 1910 por Castellani. No séc. XIX foi sugerido que esta espécie fosse o principal agente etiológico da forma crónica de *tinea corporis*^{18,26}. Desde essa altura, disseminou-se globalmente e é considerado, até hoje, o principal agente causador essencialmente de onicomicose e *tinea pedis*²⁶. Sendo o principal agente causador de infeções crónicas da pele, unhas e raramente couro cabeludo é responsável pela grande maioria das infeções fúngicas superficiais, com uma prevalência de 80%^{18,23}.

Morfológicamente, *T. rubrum* exibe um vasto espectro de características, por exemplo, a textura da superfície da cultura pode variar de algodoadada a aveludada, a cor da colónia pode variar de branco, a vermelho escuro (**Figura 1.3**)³², a pigmentação do reverso da colónia pode apresentar diversas colorações desde amarela a vermelha escura, sendo que todas estas pigmentações variam consoante o meio de cultura onde as espécies são inoculadas, bem como da estirpe/variedade da espécie (**Figura 1.4**). Relativamente ao número de microconídios e de macroconídios, este varia³².



Figura 1.3 - Morfologia de uma cultura da espécie fúngica *T. rubrum*³².

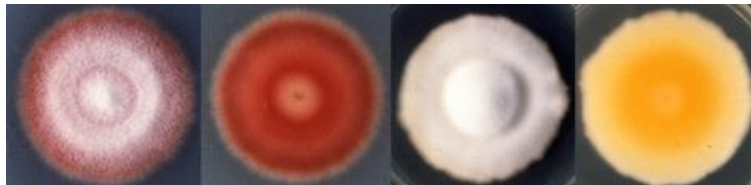


Figura 1.4 - Dependendo do meio em que a estirpe é inoculada, esta pode produzir diferentes colorações. No caso de *T. rubrum*, esta espécie produz pigmentos vermelhos e amarelos, consoante o meio utilizado³².

1.3.1.2 Interação dermatófito-hospedeiro e patogênese das dermatofitoses associadas a *T. rubrum*

Os humanos são infetados por dermatófitos através de uma fonte exógena uma vez que, este grupo de organismos não faz parte da flora fúngica normal.

Para que ocorra infecção, primeiro é necessário que os dermatófitos ultrapassem os mecanismos de defesa inata do organismo hospedeiro como por exemplo, pH naturalmente ácido da pele, a presença de queratinócitos, a presença de moléculas inibitórias como os ácidos gordos e alguns péptidos antimicrobianos, a ação de células fagocitárias e o próprio processo de descamação da pele ³³.

A invasão da epiderme pelos dermatófitos leva a uma resposta imunitária do hospedeiro, cuja patogenicidade fúngica depende de fatores fúngicos (que tipo de espécie está a provocar a infecção) e também das defesas do hospedeiro (idade, género, fatores genéticos e estado imunológico) que podem ou não permitir a colonização no tecido do hospedeiro ^{34,35}.

Portanto numa primeira fase é crucial que haja o contacto entre arthroconídios e o estrato cornificado para o estabelecimento da dermatofitose ^{33,36}. A aderência dos conídios ao estrato cornificado é facilitada através da expressão, na superfície da parede celular fúngica, de moléculas responsáveis pela adesão, as adesinas, que permitem a rápida adesão aos tecidos do hospedeiro e à matriz extracelular. Esta aderência ocorre 3–4 h após contacto inicial e os conídios germinam ao fim de 24 h. Após 3 dias, as hifas começam a disseminar-se pela pele (**Figura 1.5**) ²³. Uma vez instalado no tecido hospedeiro, o dermatófito necessita obter nutrientes para sobreviver e fá-lo através da secreção de várias endopeptidases como as subtilisinas (Sub3 e Sub4) e fungalisinas (Mep3 e Mep4) e de várias exopeptidases incluindo leucina-aminopeptidases (Laps) e Dpps que são responsáveis pela degradação da queratina dos tecidos queratinizados, ao mesmo tempo que evita células e moléculas da imunidade inata ³⁶.

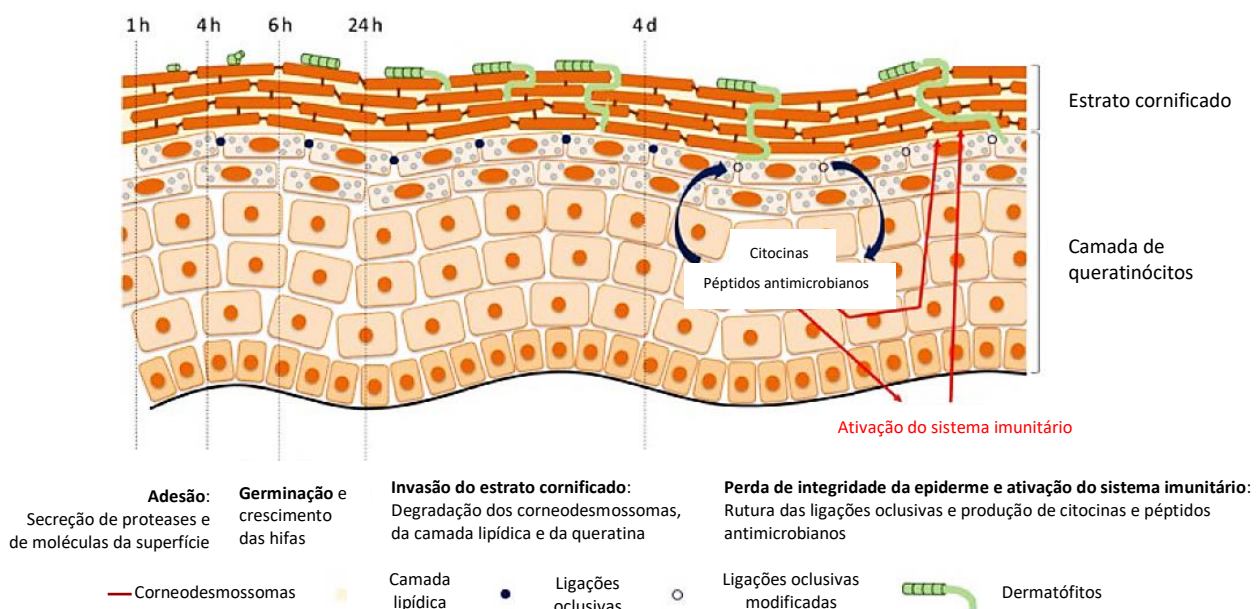


Figura 1.5 – Esquemática do mecanismo de infecção da epiderme pelo dermatófito antropofílico *T. rubrum*.

Os dermatófitos infetam a pele humana em três passos: **1)** os artrósporos aderem à epiderme do hospedeiro através da ação de proteínas especializadas presentes na superfície do fungo; **2)** Dada a adesão à epiderme, dá-se a germinação destes artrósporos, através da reativação das suas atividades metabólicas, e o crescimento das hifas; **3)** As hifas vão invadindo cada vez mais a camada cornificada da epiderme à medida que fazem a digestão da queratina. Por último, a hifa produz novos artrósporos que podem infetar novos indivíduos ou outras partes do corpo. Adaptado de Faway, E. et al., (2018) ²³.

As primeiras células encontradas pelos dermatófitos durante o processo de infecção são os queratinócitos, que não só constituem uma barreira física contra os dermatófitos como também desempenham um papel importante na defesa inata do hospedeiro. Nos primeiros estádios da infecção, os dermatófitos ao colonizar o tecido queratinizado, vão desencadear uma resposta inflamatória através da estimulação dos queratinócitos a produzir diferentes citocinas. Esta estimulação acontece a nível dos recetores de reconhecimento de padrões (RRP) presentes na superfície dos queratinócitos, tais como os *Toll-like receptors* (TLRs) e dectina-1, que ao reconhecerem os β -glucanos presentes na parede fúngica dos dermatófitos vão promover a libertação de várias citocinas pró-inflamatórias e fatores quimiotáticos (quimiocinas), que recrutam neutrófilos e monócitos (que nos tecidos se diferenciam em macrófagos) que são células inflamatórias que capturam o dermatófito e libertam citocinas, que causam reações inflamatórias tais como vermelhidão e inchaço ^{33-35,37}.

Para além da libertação de citocinas e quimiocinas, existe também por parte dos queratinócitos a secreção de péptidos antimicrobianos como β -defensinas e catelicidinas que previnem a invasão fúngica. Pode haver também a indução da imunidade adaptativa pelas células da imunidade inata, que aciona respostas Th1 e Th17 que são importantes para controlar a dermatofitose por estimularem a imunidade mediada por células ³⁴.

Os linfócitos CD4⁺, também conhecidos por células T auxiliares (Th), são considerados um componente essencial na defesa imune contra os dermatófitos ³⁸.

1.3.1.3 Patologias frequentemente associadas a infeções provocadas por *T. rubrum*

1.3.1.3.1 *Tinea pedis*

Também conhecida como pé de atleta, *tinea pedis* (Figura 1.6)³⁹ é uma infeção comum que se tem vindo a disseminar cada vez mais no mundo, devido à movimentação cada vez mais frequente entre a população, a utilização de espaços para a prática de exercício físico, espaços públicos como piscinas, balneários, utilização de calçado fechado e sintético, tudo isto leva a uma disseminação mais elevada. Aproximadamente 1/3 dos pacientes com pé de atleta tem uma infeção ungueal concomitante ³⁷.

Os pés, especialmente a região plantar e os espaços interdigitais, estão mais frequentemente envolvidos no “pé de atleta” sendo *T. rubrum* o agente etiológico mais frequentemente isolado.

Tinea pedis apresenta tipicamente 4 formas: (1) interdigital (sendo esta a mais comum), (2) inflamatória aguda vesicular, (3) tipo crónica (em formato *moccasin*) e (4) forma ulcerativa contudo, nem todas as formas são específicas para *T. rubrum* ³⁷.

A forma interdigital é predominantemente causada por *T. rubrum* seguida de *T. interdigitale* e é clinicamente caracterizada por eritema interdigital, descamação, maceração e fissuras principalmente entre o 4º e o 5º dedo do pé. Geralmente, a região dorsal do pé não é afetada, no entanto, em pacientes com VIH e em pacientes com distúrbios na funcionalidade das células T, pode haver propagação da infeção para esta região . Os sintomas mais comuns são prurido, mau odor e ardor ³⁷. Por outro lado, a infeção do tipo crónica (ou formato *moccasin*) está associada a *T. rubrum* e caracteriza-se por eritema crónico na região plantar do pé que pode provocar uma ligeira descamação e/ou hiperqueratose. A hiperqueratose pode envolver toda a região plantar, estendendo-se para a parte lateral e ao endurecer podem desenvolver-se fissuras, que ao caminhar agravam. *Tinea pedis* inflamatória aguda vesicular e a forma ulcerativa são provocadas tipicamente por *T. interdigitale* sendo a primeira caracterizada por formação de vesículas, bolhas, pústulas na região dorsal ou na região plantar e a segunda por pústulas, fissuras, úlceras que se espalham rapidamente e é frequentemente acompanhada por uma infeção bacteriana secundária ³⁷.



Figura 1.6 - *Tinea pedis*, causada por *T. rubrum* onde é visível a descamação da pele entre os dedos. Créditos: Geraldine Kaminski Library #309 and Drs G. Donald and D. Hill, Adelaide, S.A ³⁸.

1.3.1.3.2 Onicomicose

É considerada a infecção das unhas mais comum. O termo indica infecções das unhas (**Figura 1.7**) causadas por dermatófitos (*tinea unguium*), leveduras e fungos não dermatófitos. Humidade, calçado fechado, trauma constante nas unhas, predisposição genética e algumas doenças tais como diabetes, infecção com VIH bem como outras doenças imunossupressoras, são alguns dos fatores que contribuem para o seu desenvolvimento. A taxa de incidência de onicomicose aumenta com a idade, é mais prevalente em indivíduos do sexo masculino e apesar de não ser tão frequente, esta infecção pode afetar crianças principalmente devido ao uso de calçado fechado e sintético e também através de ambientes contaminados com o fungo (piscinas, ginásios) ⁴⁰⁻⁴².

A onicomicose afeta mais as unhas dos pés do que as unhas das mãos e por norma envolve sempre várias unhas e *tinea pedis* está frequentemente presente. Há diferentes tipos de onicomicose, dependendo do local da unha que é infetado: (1) onicomicose subungueal distal e lateral (DLSO) onde o fungo atinge a unha através do hiponiquio e afeta o leito ungueal, a placa ungueal e o hiponiquio. A associação com pé de atleta neste tipo de onicomicose é muito frequente; (2) onicomicose superficial branca (WSO) os fungos invadem a lâmina ungueal dorsal e formam manchas opacas esbranquiçadas. É o tipo de onicomicose menos comum. O agente etiológico mais associado a este tipo de onicomicose é *T. interdigitale* mas é possível que sejam também outros fungos filamentosos não dermatófitos; (3) onicomicose subungueal proximal (PSO) surge através da invasão de elementos fúngicos através das pregas proximais das unhas. Clinicamente, apresenta-se como uma área branca sob a lâmina ungueal proximal, na área da lúnula. Está muito associada a doentes infetados com VIH e outros doentes imunossuprimidos e é provocada por fungos filamentosos não dermatófitos; (4) onicomicose endonix é caracterizada por uma invasão da lâmina ungueal através do leito ungueal. Clinicamente, a unha infetada apresenta descoloração branco-leitosa da lâmina ungueal; e por fim (5) onicomicose distrófica total (TDO) que representa o estado mais severo e prolongado de uma onicomicose onde se observa uma destruição completa da lâmina ungueal, um forte espessamento das unhas e um aspeto amarelado. O diagnóstico clínico da onicomicose requer sempre confirmação laboratorial e o tratamento depende de diversos fatores tais como a espécie do fungo em causa e o número de unhas infetadas ^{40,41}.



Figura 1.7 - Onicomicose causada por *T. rubrum* ³¹.

1.3.1.4 Epidemiologia das dermatofitoses provocadas por *T. rubrum*

As dermatofitoses são responsáveis por 3 - 4% dos casos dermatológicos sendo a infecção superficial mais comum em humanos, com uma prevalência entre os 20-25%⁴³. No entanto, espera-se que a sua prevalência continue a aumentar, devido ao aparecimento de novos fatores de risco. Como se sabe, a patogenicidade dos dermatófitos está associada a diferentes fatores incluindo a produção de enzimas queratinolíticas, predisposição genética, certas patologias como doenças vasculares, psoríase e até mesmo a idade e o género dos indivíduos, mas doenças autoimunes como a diabetes mellitus, doenças supressoras do sistema imunitário como o VIH/SIDA ou doenças oncológicas também contribuem para um aumento na incidência deste tipo de infecção fúngica. Na atualidade, é cada vez mais frequente o aparecimento deste tipo de doenças na população que adicionalmente a todos os outros fatores de risco, faz com que haja uma tendência para o aumento da incidência de infecções fúngicas superficiais^{9,10,19,23}. As dermatofitoses consideradas mais prevalentes são a *tinea unguium* ou onicomicose e a *tinea pedis* sendo ambas provocadas, geralmente, pela espécie *T. rubrum* com uma prevalência de cerca de 80%⁴⁴. As espécies do género *Trichophyton*, são os principais agentes causadores de patologias como pé de atleta e onicomicose nas mãos e pés e estima-se que afete ~1.000.000.000 de pessoas em todo o mundo^{6,10} e esta predominância sugere que *T. rubrum* tenha uma grande capacidade de disseminação, ao contrário de outras espécies. Tal facto pode ser relacionado com o aumento da densidade populacional em áreas urbanas, elevada migração que leva à reintrodução de espécies antropofílicas, a frequência de ginásios bem como de piscinas públicas, onde as maiores fontes de transmissão são os balneários, chuveiros e tapetes partilhados, e ainda o uso de calçado fechado e sintético que causa mais humidade e pode levar à maceração do pé promovendo assim o desenvolvimento destas patologias^{9,10}.

Em Portugal, é estimado que 1.510.391 de portugueses sofram de dermatofitoses, correspondendo a uma incidência de 14.300 por cada 1.000.000 de habitantes¹⁵. Um estudo recente apresenta uma análise retrospectiva com dados recolhidos de várias instituições hospitalares da região Norte e Centro do país e da área metropolitana de Lisboa, realizada entre o ano 2014 e 2016, com o objetivo de avaliar os agentes etiológicos das micoses superficiais diagnosticadas a nível nacional, comparar a sua distribuição geográfica bem como analisar a distribuição das espécies em relação à área cutânea envolvida. Neste estudo foram identificadas 15 espécies diferentes de dermatófitos, sendo *T. rubrum* a espécie mais frequente (53,6%) e o principal agente etiológico das dermatofitoses da pele glabra e das onicomicoses dos pés, quer na região Norte e Centro quer nos hospitais da área metropolitana de Lisboa⁴³.

1.3.2 Tratamento

Existem várias manifestações cutâneas que poderão ser semelhantes a micoses mas que na verdade não o são. De facto, outras doenças, nomeadamente auto-imunes, podem também ter manifestações cutâneas e por isso, antes de prescrever qualquer terapia, é fundamental realizar um exame micológico direto e cultural de amostras de pele, cabelo ou unhas para confirmar que se trata, efetivamente, de uma infecção fúngica. São vários os fatores que deverão ser tidos em conta aquando do tratamento; este dependerá sempre do tipo de infecção, das suas manifestações clínicas (no caso de onicomicose depende também do número de unhas infetadas), da severidade da infecção, do agente etiológico, da suscetibilidade desse mesmo agente aos antifúngicos, da interação com outros medicamentos, dos efeitos secundários que cada paciente pode sofrer, da idade e de outras doenças que o paciente possa apresentar^{40,41}.

Existem dois modos de administração da terapêutica: **tratamento sistémico (oral)** e o **tratamento tópico**. O tratamento sistémico consiste na administração oral de antifúngicos durante vários meses até que o paciente esteja curado ou até que apareçam sinais de resistência ao antifúngico ou apareçam

efeitos secundários adversos, ou ambos. Este tipo de tratamento é recomendado para o tratamento de *tinea capitis* e para casos severos de *tinea cruris/tinea corporis*, *tinea pedis* e onicomicose. Por outro lado, o tratamento tópico consiste na aplicação de pomadas ou vernizes com antifúngico e é recomendado para o tratamento de *tinea corporis* localizada, bem como para pé de atleta e casos ligeiros a moderados de onicomicose. Para que o paciente fique efetivamente curado, é recomendado, sempre que possível, a realização dos dois tratamentos em simultâneo isto porque, existem algumas desvantagens quando utilizados separadamente. Quando é feito apenas o tratamento por via oral, este tratamento está limitado às interações que podem ocorrer com outros medicamentos e com a sua potencial hepatotoxicidade. Por outro lado, quando é apenas feito o tratamento tópico, a sua eficácia é mais limitada, sendo necessários vários meses para que seja efetivamente eficaz e a baixa penetração dos antifúngicos tópicos também limita o seu uso, sendo que estes dois fatores estão muito relacionados com um aumento da taxa de reinfeção, que ocorre em 20-25% dos pacientes^{9,40-42,45}.

Na prática clínica, são utilizados 4 tipos de antifúngicos para o tratamento de infeções fúngicas. Os **polienos** (dos quais fazem parte a anfotericina B e a nistatina); os **azóis** (constituídos pelo itraconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol, ketoconazol e pelo ravuconazol); as **equinocandinas** (são representadas pela caspofungina, a micafungina e pela anidulafungina) e as **alilaminas** (das quais fazem parte a terbinafina)⁴⁶.

Para o tratamento de dermatofitoses, a primeira terapia a ser prescrita é a terbinafina. A terbinafina faz parte do grupo das alilaminas sintéticas, que foi desenvolvida em 1979 e é o principal antifúngico utilizado no tratamento de pé de atleta e onicomicose, tanto por via tópica como por via oral. Este antifúngico exerce a sua função ao bloquear a biossíntese do ergosterol, análogo do colesterol, que é um componente essencial na membrana plasmática fúngica que desempenha uma variedade de funções celulares tais como fluidez e integridade da membrana, através da inibição da enzima esqualeno epoxidase (SQLE), que catalisa a conversão de esqualeno em 2,3-oxidoesqualeno, um precursor do lanosterol, que por sua vez é um precursor direto do ergosterol (**Figura 1.8**)⁴⁷. Como o ergosterol é um componente fundamental para a manutenção da estrutura e para a função da membrana plasmática fúngica, esta inibição vai comprometer a integridade da mesma^{41,45,48}. Ora se não há a conversão de esqualeno em 2,3-oxidoesqualeno, seguidamente em lanosterol e por fim em ergosterol, irá ocorrer uma acumulação de esqualeno na célula fúngica, que é um composto tóxico para as células^{44,49}.

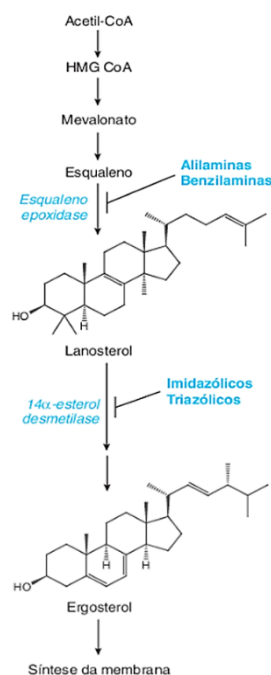


Figura 1.8 - Via de síntese do ergosterol⁴⁴.

Geralmente, a terbinafina é bem tolerada sendo os efeitos secundários mais comuns a nível gastrointestinal (diarreia, dispepsia, dor abdominal), a nível cutâneo (prurido, urticária) e pode também afetar o sistema nervoso central através da manifestação de dores de cabeça e dificuldade de concentração ^{41,42,45,50}.

1.3.3 A problemática da resistência aos antifúngicos

As infeções provocadas por *T. rubrum* e, em particular, a onicomicose, são frequentemente difíceis de tratar, sendo muito frequente ocorrerem reinfeções após a interrupção da terapia antifúngica prescrita. Uma das razões pelas quais a reinfeção acontece, é a baixa adesão a regimes de tratamento de longo prazo com recurso a antifúngicos tópicos. Por sua vez, as reinfeções após a interrupção da terapia antifúngica podem também ser devidas à aquisição de resistência por parte do fungo *T. rubrum*, especialmente no caso de infeções que envolvam tratamento prolongado com concentrações relativamente baixas de fármacos ⁵¹.

O uso crescente de antifúngicos tem provocado uma maior pressão seletiva sobre as diferentes espécies de fungos, onde as espécies sensíveis vão sendo substituídas por estirpes resistentes, levando assim ao aparecimento de resistências provocando uma modificação na epidemiologia das infeções fúngicas, levando a um desenvolvimento de resistências secundárias em várias espécies ¹⁹.

A realização de testes de suscetibilidade a determinados antifúngicos, torna possível detetar mais precocemente resistências aos antifúngicos através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) (determinada através das microdiluições em caldo) que consiste na menor concentração de antifúngico necessária para inibir o crescimento de um fungo, neste caso filamentosos, e desta forma torna-se mais fácil de determinar qual o melhor tratamento para um fungo específico ^{7,19}.

Na prática clínica, são vários os antifúngicos prescritos para o tratamento de infeções provocadas por *T. rubrum* ⁵¹. Apesar da enorme disponibilidade de agentes anti-dermatófitos, a prevalência de dermatofitoses permanece inalterada devido ao aumento da incidência de infeções crónicas e recorrentes, reinfeção em populações suscetíveis e à falha do tratamento ⁴⁹.

1.3.3.1 Mecanismos de resistência de *T. rubrum* ao antifúngico terbinafina

Para que as terapias sejam bem-sucedidas é fundamental haver uma compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes.

Medicamentos como a terbinafina e os azóis são usados em grande escala no tratamento de infeções provocadas por dermatófitos e a aquisição de resistência aos antifúngicos por parte destes resulta, geralmente, da modificação das enzimas alvo por mutação. Além das mutações *missense* nos genes que codificam a enzima-alvo do antifúngico, a resistência antifúngica também pode ser adquirida pela sobreexpressão de genes que codificam transportadores MFS-MDR (proteínas que pertencem à superfamília dos facilitadores maioritários, envolvidos no processo de resistência a múltiplos fármacos) em muitos fungos tendo já sido descritos vários genes de transportadores ABC tais como *mdr1*, *mdr2*, e *mdr4* em *T. rubrum*, assim como o aumento do efluxo de fármacos ou sobreexpressão de enzimas alvo são também mecanismos presentes nos dermatófitos responsáveis pela aquisição de resistência a antifúngicos (**Figura 1.9**) ^{7,24,34,48,51}.

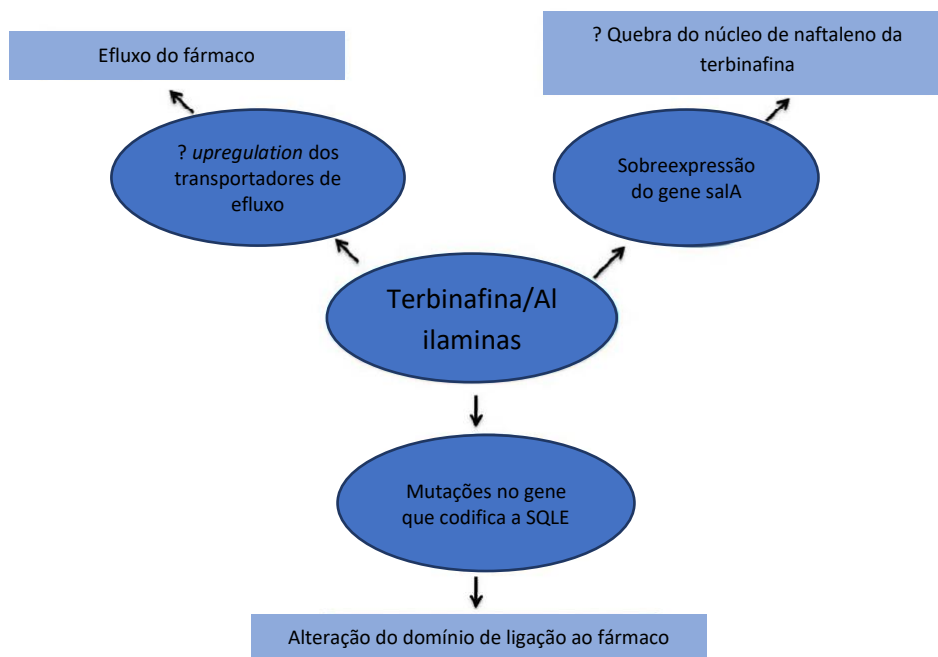


Figura 1.9 - Mecanismos de resistência à terbinafina em dermatófitos. Adaptado de Khurana, A., Sardana, K. e Chowdhary, A., (2019) ⁴⁸.

Sabe-se que o principal mecanismo de resistência à terbinafina se deve a mutações pontuais no gene que codifica a enzima esqualeno epoxidase (SQLE), que como já foi dito anteriormente, está envolvida em um dos passos iniciais da biossíntese do ergosterol, composto fundamental na membrana da célula fúngica.

Anteriormente a 2017, apesar de serem raramente descritos isolados clínicos de *T. rubrum* resistentes à terbinafina, apenas tinham sido documentados dois casos de resistência à terbinafina na Europa ^{52,53}. O primeiro caso a ser registado devido a falha terapêutica, foi através de uma investigação desenvolvida por Mukherjee et al.⁵³, onde foram detetados 6 isolados de *T. rubrum* de um único paciente com onicomicose, resistentes à terbinafina com uma CMI de 4µg/mL, detetada através das técnicas de microdiluição e macrodiluição de cada um dos isolados. Posteriormente, foi demonstrado, através da sequenciação do gene que codifica a esqualeno epoxidase, que esta resistência se devia a uma mutação pontual na posição 1177 na grelha de leitura aberta (ORF) (¹¹⁷⁷TTA →TTT) desse mesmo gene que levou à substituição de um aminoácido, mais precisamente uma leucina por uma fenilalanina, na posição 393. Esses resultados demonstraram convictamente que essa substituição de aminoácidos na proteína final da SQLE, afetaria negativamente a afinidade do agente antifúngico para a enzima e consequentemente a suscetibilidade do organismo ao antifúngico ^{54,55}.

Mais tarde, foi caracterizada outra estirpe de *T. rubrum* fortemente resistente à terbinafina com uma CMI de 64µg/mL. Neste caso, a sequência do gene da SQLE continha uma substituição *missense* na posição 1189 na ORF do gene da enzima (¹¹⁸⁹TTC → CTC) que levou à substituição do aminoácido fenilalanina por uma leucina, na posição 397 ⁵².

Ambas as mutações introduziram substituições *missense* (L393F num caso e F397L no outro), que se traduziram numa CMI muito superior ao expectável.

Desde 2017, que têm aumentado a um ritmo alarmante os casos de resistência à terbinafina em diferentes áreas geográficas.

Tabela 1.1 - Características fenotípicas e genotípicas dos isolados clínicos de pacientes com infecções provocadas por dermatófitos. Adaptado de Yamada et al., (2017) ⁴⁴.

Espécie e nº do isolado ^a	Tipo de infecção	Crescimento c/ terbinafina ^b	Nucleótido substituído no gene da <i>SQLE</i>	Substituição de aminoácido	Terbinafina CMI (µg/ml)	Níveis de expressão gênica da <i>SQLE</i> (média ± DP) ^d
<i>T. interdigitale</i>						
ATCC MYA-4439			Nenhum	Nenhum	0.00625	ND
<i>T. rubrum</i>						
CBS118892			Nenhum	Nenhum	ND ^c	1.08 ± 0.47
TIMM20083	Tinea pedis	+++	1177TTA → TTT	L393F	6.4	1.26 ± 0.48
TIMM20084	Tinea pedis	+++	1177TTA → TTT	L393F	3.2	0.67 ± 0.25
TIMM20093	Tinea pedis	+++	1177TTA → TTT	L393F	6.4	ND
TIMM20094	Tinea unguium	+++	1177TTA → TTT	L393F	6.4	ND
TIMM20088	Tinea unguium	+++	1177TTA → TCA	L393S	1.6	ND
TIMM20095	Tinea unguium	+++	1177TTA → TCA	L393S	ND	ND
TIMM20085	Tinea unguium	+++	1189TTC → TTA	F397L	3.2	ND
TIMM20086	Tinea unguium	+++	1189TTC → CTC	F397L	6.4	0.72 ± 0.29
TIMM20087	Tinea unguium	+++	1189TTC → TTA	F397L	ND	0.64 ± 0.27
TIMM20092	Tinea pedis	+++	1189TTC → CTC	F397L	>12.8	ND
TIMM20091	Tinea pedis	+++	1189TTC → ATC	F397I	0.8	ND
TIMM20097	Tinea unguium	+	1189TTC → GTC	F397V	ND	ND
TIMM20090	Tinea unguium	+++	1305TTC → ATC	F415I	0.1	ND
TIMM20098	Tinea pedis	+	1305TTC → TCC	F415S	ND	ND
TIMM20082	Tinea unguium	+++	1305TTC → GTC	F415V	0.4	ND
TIMM20089	Tinea unguium	+	1380CAT → TAT	H440T	0.1	ND
<i>T. interdigitale</i>						
TIMM20096	Tinea unguium	+++	1189TTC → CTC	F397L	3.2	ND

^aTodos os isolados clínicos foram obtidos na Suíça e depositados na coleção de culturas do Instituto de Micologia Médica da Universidade de Teikyo (TIMM).

^bA capacidade de crescimento dos isolados clínicos em SDA contendo 0.2µg/ml de terbinafina está indicada de fraca (+) a elevada (+++).

^cND, não determinado.

^dOs resultados representam os níveis de expressão de três reações independentes de PCR em tempo real. Os níveis de expressão gênica da *SQLE* foram indicados como "fold changes" relativos em comparação com a média CT da estirpe *wild-type* CBS118892.

Na Suíça, a prevalência de isolados das espécies *T. rubrum* e *T. interdigitale* resistentes à terbinafina obtidos após cultura de amostras de unhas é de cerca de 1% (17 casos em 2056 isolados testados) segundo um estudo realizado por Yamada et al.⁴⁴. Este valor é considerado pelo autor surpreendentemente elevado tendo em conta que o tamanho médio do genoma dos dermatófitos é de aproximadamente 22 Mb ⁴⁴.

De acordo com esse estudo, todos os 17 isolados clínicos estudados de *Trichophyton* (16 pertencentes à espécie *T. rubrum* e 1 pertencente à espécie *T. interdigitale*) com baixa suscetibilidade à terbinafina, revelaram alelos do gene *SQLE* com mutações pontuais, que levaram a substituições de aminoácidos em uma das quatro posições de aminoácidos (Leu393, F397, F415 e His440) dentro da proteína *SQLE*, demonstrando também pela primeira vez que a substituição do aminoácido His440 presente na proteína *SQLE* de *T. rubrum*, confere também resistência à terbinafina (**Tabela 1.1**) ⁴⁴. Ainda neste estudo, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de expressão gênica da *SQLE* entre quatro isolados *T. rubrum* e a estirpe de controlo, o que indica que a resistência à terbinafina por parte destes isolados se deve às mutações pontuais encontradas na sequência de aminoácidos da *SQLE* e não aos níveis de expressão gênica da *SQLE* ⁴⁴.

Também se têm verificado casos de resistência à terbinafina quando a infecção é causada por *T. interdigitale*.

Um estudo realizado por Singh et al. (2018)⁵⁶, descreveu, numa amostra total de 67 isolados *Trichophyton*, 20 isolados *T. interdigitale* altamente resistentes à terbinafina obtidos a partir de casos de *tinea corporis* e *tinea cruris* provenientes de três hospitais em Dehli, Índia. Todos estes isolados exibiram CMIs elevadas (entre 4 a ≥ 32µg/mL) descrevendo assim uma taxa de resistência à terbinafina consideravelmente elevada (32%). Posteriormente, com recurso à sequenciação do gene *SQLE*, foi possível conferir que todos esses 20 isolados possuíam mutações pontuais nesse gene, sendo que 60% (n=12) dos isolados continham a substituição F397L e os restantes 40% (n=8) apresentaram a substituição L393F ⁵⁶.

Todas estas substituições nos aminoácidos da proteína final da SQLE derivadas de mutações *missense* no gene que codifica a mesma, sugerem que ocorram alterações estruturais desta proteína, que podem assim estar envolvidas na reduzida suscetibilidade à terbinafina. Graças ao trabalho de Rudramurthy et al. ⁴⁹, foi possível verificar através de uma representação em 3D da estrutura da proteína que, a mutação se encontra no domínio do local de ligação da molécula, o que pode levar ao fracasso da interação fármaco-enzima (**Figura 1.10**) ⁴⁹.



Figura 1.10 - Representação da estrutura em 3D da proteína *wild-type* e da proteína mutante a verde e a vermelho, respetivamente. A mudança dos aminoácidos de fenilalanina para leucina (F397L) distorce a estrutura da proteína ⁴⁹.

A mesma mutação T1189C que leva à substituição F397L responsável pela resistência à terbinafina, foi também descrita em *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans* e *Sacharomyces cerevisiae* (**Figura 1.11**) ^{7,49,57}.

		(F389L)																		
		(L398F)	(F391L)																	
		F402L				F420L			P430S	F433S										
<i>S. cerevisiae</i>	393	VLSVAI	YSLF	FAADSDNLKALQKGC	FKYF	CRGGDCVNKP	VEFL	SG												
<i>C. albicans</i>	393	TLISIS	YSLF	FAADKKPLRILRNGC	FKYF	CRGGECVNGPI	ISLL	SG												
<i>A. fumigatus</i>	380	ILAQA	YSLF	FAADNQYLRALQ	RGC	FRYF	QLG	--LVDG	PAGL	LEG										
<i>A. nidulans</i>	382	ILAQA	YSLF	FAADDDNLKALQ	RGC	FQYF	SMG	--MYET	PVSL	LEG										
<i>T. rubrum</i>	388	ILAQA	YSD	FAAGDPNLKVLQ	RGC	FRYF	QLG	--LIDG	PIGL	LEG										
		L393F	F397L																	

Figura 1.11 - Alinhamento da sequência de aminoácidos de um domínio altamente conservado da esqualeno epoxidase de *T. rubrum* com membros da família da SQLE fúngica, onde as substituições de aminoácidos afetam a suscetibilidade à terbinafina ⁷.

As 4 substituições de aminoácidos que conferem resistência à terbinafina na espécie *S. cerevisiae* estão indicadas na parte de cima do alinhamento (F402L, F420L, P430S e F433S) representados na **Figura 1.11**. A substituição F402L corresponde às substituições F389L e F391L na proteína da SQLE que confere resistência à terbinafina nas espécies *A. fumigatus* e *A. nidulans*, respetivamente. Na espécie *C. albicans* a substituição que confere resistência à terbinafina corresponde à substituição L398F. Quando se analisa o alinhamento de aminoácidos de *T. rubrum* verifica-se que as substituições ocorrem exatamente na mesma posição de outras espécies. Posto isto, é então sugerido que esta mutação no gene da SQLE provoque resistência à terbinafina em diferentes fungos ^{7,49,57}.

Desta forma, a análise do efeito das substituições de aminoácidos que se traduzem em resistência aos antifúngicos, neste caso em particular à terbinafina, pode ser bastante útil na compreensão das

interações entre enzimas-alvo e respetivos fármacos e assim, definir uma melhor terapia para cada caso.

De acordo com as normas CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) e a EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), não existem valores de corte clínico estabelecidos para *T. rubrum* e *T. interdigitale*, a partir dos quais se passa a considerar determinada estirpe como resistente à terbinafina. No entanto, em conformidade com o mais recente estudo desenvolvido por Saunte et. al ⁵⁸, são propostos como valores de corte epidemiológico os valores 0.06mg/L ou 0.125 mg/L (valores referência utilizados neste trabalho para os meios de screening). Recentemente, em Setembro de 2020, a EUCAST propôs, para vários antifúngicos incluindo a terbinafina, valores de corte epidemiológicos provisórios para as espécies *T. rubrum* e *T. interdigitale*, para os quais, valores inferiores ou iguais a esses valores as espécies são consideradas *wild-type* sendo esses, respetivamente, 0.03 mg/L e 0.125 mg/L ⁵⁹. Relativamente às gamas de valores de CMI para os quais as estirpes são classificadas como tendo baixa resistência, resistência moderada e resistência elevada, num estudo efetuado por Saunte et. al, categorizaram-se os isolados de *T. rubrum* e *T. interdigitale* resistentes como tendo elevada resistência à terbinafina se a CMI fosse entre os 4 a >8 mg/L, resistência moderada se a CMI fosse entre 1 a 2 mg/L e baixa resistência se a CMI fosse entre 0.125 a 0.25 mg/L ⁵⁸.

2 Objetivos

O estudo apresentado visou caracterizar isolados de dermatófitos tendo por base as suas características fenotípicas (morfologia, metabolismo e outras) e genotípicas, recorrendo a sequenciação de regiões específicas do genoma. Para tal, analisaram-se isolados de *Trichophyton* guardados na coleção de culturas do Laboratório Nacional de Referência de Infecções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge bem como isolados colecionados prospectivamente a partir de várias amostras de tecidos queratinizados com suspeita de infeção por dermatófitos recebidas diariamente no mesmo Laboratório. Pretendeu-se otimizar várias metodologias moleculares de forma a efetuar a identificação molecular de dermatófitos ao nível da espécie, verificando-se a aplicabilidade da sequenciação da região ITS e do gene da calmodulina. Dado que o tratamento destas infeções é demorado e por vezes ocorre falência terapêutica, pretendeu-se desenvolver, otimizar e implementar metodologias que permitam efetuar a avaliação da resistência de isolados de *T. rubrum* ao antifúngico terbinafina, quer por método cultural quer por deteção de mutações que conferem resistência a este composto. Por último, este estudo teve o intuito de também determinar a frequência de isolados de *T. rubrum* (do universo dos testados) que apresentam resistência à terbinafina.

3 Materiais e Métodos

3.1 Amostras biológicas

3.1.1 Colheitas e procedimento cultural

Este estudo foi realizado com isolados de produtos biológicos queratinizados que foram obtidos em colheitas realizadas em utentes com suspeita de dermatofitose no período de 2017 a 2020. Estas amostras são recebidas diariamente pelo Laboratório Nacional de Referência de Infecções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge onde se efetua a colheita de produtos biológicos (unhas, pele, couro cabeludo/cabelos) com suspeita de dermatofitose. Para além das amostras colhidas na instituição, são também recebidas amostras enviadas por clínicas, centros de saúde, hospitais, ou outros laboratórios de todo o país.

A colheita de amostras de pele, unhas e cabelo/couro cabeludo é realizada de maneiras distintas, embora muito semelhantes.

Em casos de lesões na pele, a pele deverá ser desinfetada com álcool a 70% de forma a remover bactérias superficiais e fungos ambientais para evitar contaminações. O material deverá ser raspado com recurso a um bisturi cirúrgico estéril de ponta redonda para uma placa de Petri estéril ⁶⁰. De seguida, deve-se passar uma zaragatoa embebida em água destilada estéril na área onde foi feita colheita de forma a apanhar algum material biológico restante ⁶⁰ (Por ser um documento interno, sem acesso livre, não foi possível disponibilizar a documentação relativa aos procedimentos de colheitas de produtos queratinizados com o nome: “Manual de Colheitas: Exame micológico para pesquisa e identificação de dermatófitos e fungos potencialmente queratinofélicos – Pele (INSA)”).

Em casos suspeitos de dermatofitose em pêlos e/ou cabelos, a área suspeita de infeção é limpa e desinfetada como anteriormente e com ajuda de uma pinça, é retirado o cabelo/pêlo. É importante garantir que o cabelo/pêlo venha com raiz. Para além do cabelo/pêlo, deverá também ser colhido escamas do couro cabeludo da área suspeita de infeção com recurso a uma zaragatoa embebida em água destilada estéril ⁶⁰ (Por ser um documento interno, sem acesso livre, não foi possível disponibilizar a documentação relativa aos procedimentos de colheitas de produtos queratinizados com o nome: “Manual de Colheitas: Exame micológico para pesquisa e identificação de dermatófitos e fungos potencialmente queratinofélicos – Cabelo e Couro Cabeludo (INSA)”)..

Em casos de onicomicose, as mãos e os pés deverão ser lavados com água e sabão, dando maior ênfase nas unhas. Após secagem, as unhas deverão ser desinfetadas com álcool a 70% e a colheita deve ser feita através de raspagem da unha infetada ou através do corte da própria unha, o mais próximo possível da área infetada, e por último deve-se passar uma zaragatoa embebida em água destilada estéril de forma a garantir a colheita de algum material restante ⁶⁰ (Por ser um documento interno, sem acesso livre, não foi possível disponibilizar a documentação relativa aos procedimentos de colheitas de produtos queratinizados com o nome: “Manual de Colheitas: Exame micológico para pesquisa e identificação de dermatófitos e fungos potencialmente queratinofélicos – Unha (INSA)”)..

Depois de feita a colheita, fez-se a sementeira dos produtos biológicos queratinizados na câmara de fluxo laminar (Classe II). As amostras biológicas foram inoculadas em três meios - tubo com meio SDA em rampa suplementado com cloranfenicol (0.05%), um tubo com meio Mycosel agar em rampa com cloranfenicol e um tubo com meio Sabouraud dextrose líquido também suplementado com cloranfenicol (onde se inocula a zaragatoa). Aquando da inoculação dos produtos queratinizados, foram também realizados controlos positivo e negativo. Para controlo positivo, fez-se a inoculação de uma estirpe de referência (*Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533) nos mesmos meios utilizados na inoculação das amostras biológicas e a mesma técnica de inoculação (ansa ou zaragatoa estéreis). Para o controlo negativo, os meios foram incubados nas mesmas condições, mas sem serem inoculados. Como controlo da esterilidade da câmara de fluxo laminar, foi utilizada uma placa com meio malte aberta durante o período de inoculação das amostras e incubada na estufa a 35°C, durante

cinco dias. As amostras foram incubadas na estufa a 27°C, no mínimo durante três semanas. Quando a quantidade de amostra biológica nos permitiu, foi sempre realizado um exame microscópico direto. Colocou-se a amostra numa lâmina com uma gota de hidróxido de potássio (KOH) a 30%, cobriu-se com uma lamela e aguardou-se algum tempo antes da observação, de forma a garantir que o KOH consiga degradar os tecidos queratinizados e facilitar, assim, a observação de estruturas fúngicas.

3.2 Caracterização dos isolados de *Trichophyton*

Após resultado cultural positivo, foi necessário identificar a espécie obtida. Após observação macro e microscópica dos isolados, verificaram-se quais teriam características compatíveis com dermatófitos, nomeadamente com as espécies *T. rubrum* e *T. interdigitale* (muito semelhantes macro e microscopicamente).

Posteriormente, cada um dos isolados foi repicado para meio malte com cloranfenicol e incubado a 30°C durante sete/catorze dias, de modo a garantir a purificação das colónias. A confirmação da identificação da espécie foi realizada através de espectrometria de massa - MALDI-TOF MS e/ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com sequenciação da região ITS do RNA ribossomal e do gene da calmodulina. Estas metodologias serão de seguida descritas com mais detalhe.

- **MALDI-TOF** *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry*).

A tecnologia MALDI-TOF (**Figura 3.1**)⁶¹ funciona por deteção e determinação do peso molecular das proteínas dos microrganismos ⁶².

Cada poço do slide é atingido por um laser que ioniza as amostras e é libertada uma “nuvem” de proteínas que é acelerada por uma carga elétrica. Ao passar através do eletrodo de anel, é registado e medido o tempo de voo das moléculas, sendo que as moléculas com menos peso molecular atravessam mais rapidamente o anel, seguidas das moléculas progressivamente mais pesadas. É gerado, então, um espectro de massa que representa o número de iões que atingem o detetor ao longo do tempo. As proteínas são detetadas com um sensor para criar um espectro que representa a composição proteica de cada amostra e a identificação é feita através da comparação dessa composição proteica obtida, com padrões de proteínas específicos da espécie incluídos numa vasta biblioteca de espectros de referência. Dependendo do grau de conformidade, o microrganismo é identificado ao nível da espécie, género e família ^{63,64}.

No Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, o aparelho utilizado na identificação de microrganismos através da tecnologia MALDI-TOF foi o aparelho VITEK® MS da bioMérieux.

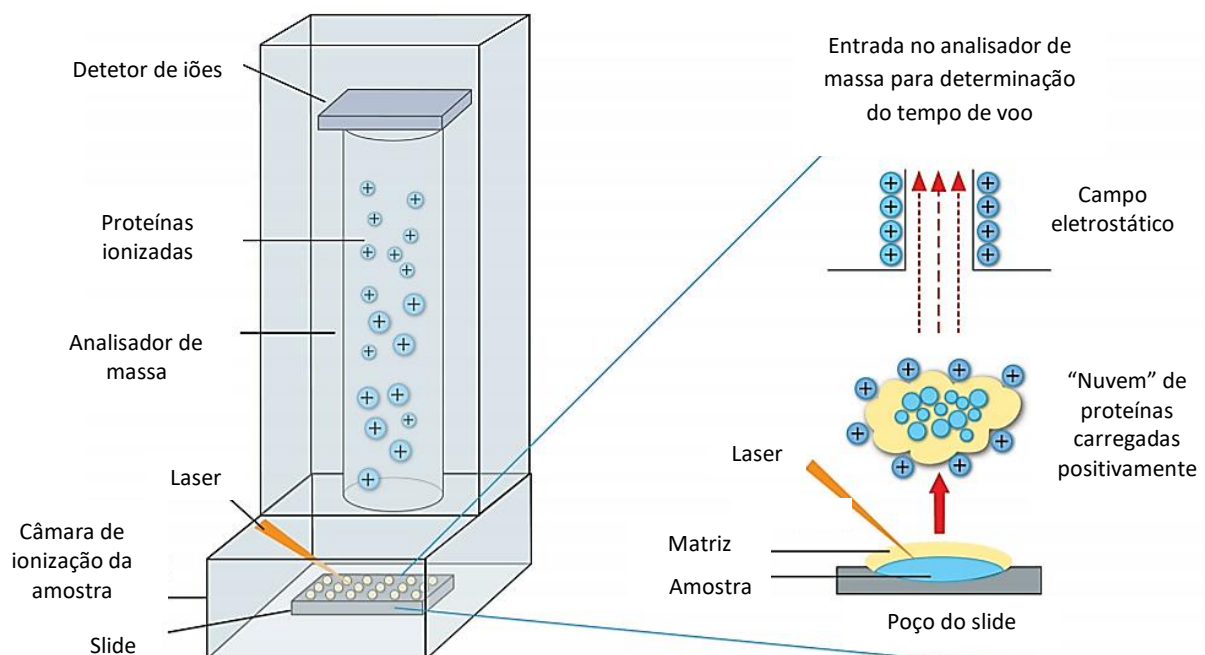


Figura 3.1 – Representação da tecnologia MALDI-TOF. Adaptado de Patel, R., (2015) ⁶¹.

Protocolo MALDI-TOF para fungos filamentosos:

1. Recolher esporos da superfície da colónia (em área com cerca de 1 a 2 cm de diâmetro) utilizando zaragatoa embebida em água;
2. Suspender o conteúdo recolhido pela zaragatoa num tubo de 2ml contendo 900µl de Etanol 70%;
3. Vórtex durante 1 minuto;
4. Centrifugar durante 2 minutos a 10000-14000g;
5. Rejeitar o sobrenadante, usando uma pipeta;
6. Adicionar 40µl de Ácido Fórmico 70% e homogeneizar no vórtex durante 1 minuto;
7. Adicionar 40µl de Acetonitrile e homogeneizar no vórtex durante 1 minuto;
8. Centrifugar durante 2 minutos a 10000-14000g;
9. Depositar 1 µl do controlo de leitura (*Escherichia coli* NCTC 12923 / ATCC® 8739) e quando secar, adicionar 1µl de matriz CHCA;
10. Depositar 1µl do sobrenadante das amostras e quando secar, adicionar 1µl da matriz CHCA;
11. Colocar o slide no aparelho VITEK® MS e aguardar que a leitura esteja concluída.

• PCR

As extrações de DNA foram realizadas através da utilização de um kit de extração de DNA “*High Pure PCR Template Preparation Kit*” (Roche) de acordo com as instruções do fabricante correspondente à versão 25 de junho 2007 com a referência 11796828001, na secção 2.7.

Para confirmação da identificação inicial da espécie, foram realizadas reações de PCR de amplificação para amplificação da região ITS. Uma vez que o gene da calmodulina apresenta uma grande variabilidade interespecífica e baixa variabilidade inter-específica, a sua sequenciação permite a identificação de um isolado ao nível da espécie de forma precisa (distinguindo espécies do mesmo complexo). De forma a verificar a compatibilidade de resultados (sequenciação da região ITS/gene da calmodulina), foi também testada e otimizada a reação de amplificação e sequenciação parcial do gene da calmodulina.

Tabela 3.1 - Primers utilizados na caracterização molecular das espécies positivas para dermatófitos.

Região amplificada ou sequenciada	5' -> 3'	Primer	Sequência
Região ITS	<i>Forward</i>	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACC TTGCGG-3'
	<i>Reverse</i>	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
Gene Calmodulina	<i>Forward</i>	cmd5	5'-CCGAGTACAAGGAGGCCTTC-3'
	<i>Reverse</i>	cmd6	5'-CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3'

Para a reação de amplificação da região ITS e para a calmodulina, a reação de PCR foi realizada num volume total de 25µl contendo, respetivamente 1,5µl e 1,75µl de cada *primer* a 10µM, 1 esfera de mix liofilizada (illustra™ puReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads, GE Healthcare Life Sciences), 18µl de

água ultrapura e 4µl de DNA. As condições de cada reação, encontram-se descritas na **Tabela 3.2** e **Tabela 3.3**, respetivamente.

Tabela 3.2 - Condições de PCR utilizadas na amplificação da região ITS.

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	4,5 min	1x
Desnaturação Hibridação Extensão	95°C 50°C 72°C	30 seg 30 seg 1 min	40x
Extensão final	72°C	3 min	1x

Tabela 3.3 -Condições de PCR utilizadas na amplificação do gene da calmodulina.

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	10 min	1x
Desnaturação Hibridação Extensão	95°C 55°C 72°C	30 seg 30 seg 1 min	38x
Extensão final	72°C	7 min	1x

Após a PCR, prosseguiu-se para a electroforese em gel de agarose a 2%. Para tal, dissolveu-se 1,8g de agarose (SeaKem® LE Agarose) em 90mL de tampão TBE 0,5x e adicionou-se, com ajuda de uma pipeta, 2µl de GelRed® *Nucleic Acid Gel Stain*. Posteriormente, fez-se a corrida do gel a 120V durante 40/50 minutos. De seguida, foi feita a visualização do gel através de um transiluminador com recurso ao *software* Quantity One da Bio-Rad.

De maneira a purificar o DNA amplificado, utilizou-se 1,6µl de Exo-Star com 4µl do produto de PCR e realizou-se um ciclo a 37°C durante 15 minutos e outro ciclo a 80°C durante 15 minutos no termociclador.

Para a PCR de sequenciação, foram utilizados os mesmos *primers* representados na **Tabela 3.1**. A reação de PCR foi realizada num volume final de 10µl contendo, 3µl de água ultrapura, 1µl de BigDye, 3µl de tampão próprio para sequenciação, 2µl dos respetivos *primers* e por último, 1µl de produto de PCR purificado. As condições de PCR estão representadas na **Tabela 3.4** para a sequenciação da região ITS e para a sequenciação do gene da calmodulina.

O sequenciador utilizado para determinar a sequência de bases foi o ABI PRISM da Applied Biosystems e o software que vem incorporado para análise do DNA é o GeneScan ® Analysis.

Tabela 3.4 -Condições de PCR utilizadas para a sequenciação da região ITS e do gene da calmodulina.

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	96°C	5 min	1x
Desnaturação Hibridação Extensão	96°C 50°C 60°C	10 seg 5 seg 4 min	30x
Extensão final	72°C	5 min	1x

3.3 Testes de suscetibilidade aos antifúngicos

3.3.1 Preparação do antifúngico terbinafina para os meios de *screening* (meios agar suplementados)

Preparou-se meios SDA sem cloranfenicol suplementados com terbinafina (Novartis Research Institute, Vienna, Áustria) em duas concentrações: 0.06 mg/L e 0.125 mg/L. Para além destes, foi também preparado meio SDA sem cloranfenicol e sem antifúngico que serviu como controlo de crescimento para garantia da viabilidade das estirpes.

Para preparar a solução de antifúngico com uma concentração final de 0.06 mg/L, pesaram-se 12.5 mg de terbinafina liofilizada (100% potência) e diluiu-se em 100 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Desta forma, por cada 2 litros de meio SDA era adicionada uma alíquota de 1mL da suspensão anterior. Para a solução de antifúngico com uma concentração final de 0.125 mg/L, pesou-se 25 mg de terbinafina liofilizada e diluiu-se em 100ml de DMSO. Posteriormente, por cada 2 litros de meio SDA, adicionou-se uma alíquota de 1 ml da suspensão. O esquema ilustrativo da metodologia encontra-se apresentado na *Figura Suplementar 1*.

3.3.2 Pesquisa de isolados de *T. rubrum* e *T. interdigitale* resistentes à terbinafina por meio de *screening*

Para testar a suscetibilidade dos isolados em meio de agar suplementado com terbinafina foi efetuada uma suspensão de conídios em soro fisiológico com uma densidade correspondente a 0.5McFarland (McF). Com recurso a uma zaragatoa, inoculou-se cada isolado em cada um dos meios suplementados com terbinafina (nas duas concentrações definidas) e em meio de SDA sem antifúngico (servindo de controlo positivo) através da técnica do riscado em estrias finas em diferentes sentidos. Posteriormente, incubaram-se as placas de Petri a 27°C durante 15 dias. No 7º, 10º e 15º dia após inoculação, foram efetuados leituras e registos fotográficos dos isolados, conforme sugerido em bibliografia mais recente ⁴⁴. Por não nos ter sido possível adquirir nenhuma estirpe de *T. rubrum* resistente, não foi realizado um controlo positivo nas placas suplementadas com antifúngico. O esquema ilustrativo da metodologia encontra-se apresentado na *Figura Suplementar 2*.

3.3.3 Determinação da suscetibilidade à terbinafina pelo método de microdiluição em placa

Após pesquisa de isolados *T. rubrum* e *T. interdigitale* resistentes à terbinafina por meio de *screening*, foi necessário determinar qual a CMI de cada um destes isolados e também de 16 isolados suscetíveis, para efeitos comparativos.

Neste estudo seguiu-se a metodologia CLSI M38A-2 ⁶⁵, nomeadamente com a utilização de meio RPMI 1640, as microplacas utilizadas foram as de fundo redondo, a standardização do inóculo foi feita recorrendo ao espectrofotómetro ($\lambda= 530\text{nm}$ e 65-70% transmitância) e a suspensão foi preparada entre os 1×10^3 UFC/mL a 3×10^3 UFC/mL, de acordo com o descrito em estudos recentes ^{66,67}.

O esquema do protocolo das microdiluições, encontra-se representado na **Figura Suplementar 3**.

Inicialmente, foi necessário, mais uma vez, inocular cada um dos isolados para meio malte/SDA com cloranfenicol e incubado a 30°C durante sete/catorze dias, de modo a garantir a purificação e a esporulação das colónias.

De seguida, foi feita a inoculação das microplacas com inóculo preparado de cada isolado sendo posteriormente incubadas a 25°C, durante 5-7 dias.

A leitura dos resultados foi efetuada no sétimo e último dia de incubação. A interpretação dos resultados foi realizada através da observação da redução em 80% do crescimento *in vitro*, nos poços da microplaca com diluições seriadas de terbinafina, em comparação com o crescimento da estirpe no poço sem a presença do antifúngico (controlo positivo).

Como controlo positivo, foi utilizada a estirpe ATCC 204 304 *A. flavus* cuja CMI para a terbinafina está entre 0.25 - 1 mg/L.

3.4 Amplificação e sequenciação do gene da SQLE para pesquisa de mutações que confirmam resistência à terbinafina em *T. rubrum* e *T. interdigitale*

Para que fosse possível pesquisar e perceber quais as mutações envolvidas no mecanismo de resistência à terbinafina por parte de *T. rubrum* e *T. interdigitale*, foi necessário implementar a técnica de PCR para amplificação e sequenciação do gene codificante da enzima SQLE, o principal alvo do antifúngico terbinafina. Para isso, e com base nos trabalhos desenvolvidos por Yamada *et. al* ⁴⁴, Khurana *et. al* ⁶⁸ e Singh *et. al* ⁵⁶ foram realizadas reações de PCR de amplificação e sequenciação do gene completo da SQLE, utilizando os *primers* F1 e R1 (**Tabela 3.5**). No entanto e como otimização da técnica a desenvolver, realizou-se, em fase posterior, amplificação e sequenciação parcial do mesmo gene (520 pb) utilizados os primers Drsq1 e Drsq2 (**Tabela 3.5**) ⁶⁹.

Tabela 3.5 - Primers utilizados na amplificação e sequenciação do gene da SQLE presentes em *T. rubrum* e *T. interdigitale*.

Região amplificada e sequenciada	5' -> 3'	Primer	Sequência	Referência
Gene <i>SQLE</i>	<i>Forward</i>	F1	5'- ATGGTTGTAGAGGCTCCTCCC -3'	Terbinafine resistance of Trichophyton clinical isolates: Yamada et al 2017; Correlation of in vitro susceptibility based on MICs and SQLE mutations: Ananta Khurana et al 2018; High terbinafine resistance in <i>T. interdigitale</i> isolates in Delhi: Ashutosh Singh 2018.
	<i>Reverse</i>	R1	5'- CTAGCTTTGAAGTTCGGCAAA -3'	
	<i>Forward</i>	Drsq1	5'-TTGCCAACGGAGGTGTAAAG -3'	Antifungal drug susceptibility profile of clinically important: Zahra Salehi 2018;
	<i>Reverse</i>	Drsq2	5'- GGGGCCATCTATAAGTCCAAGTT -3'	

A mistura de reação de amplificação do gene *SQLE* foi a mesma para os dois pares de primers utilizados: volume final de 25 µl constituído por: 1,5µl de *primer forward* e *reverse* a 10µM, 18µl de água ultrapura, 1 esfera de mix liofilizada (illustra™ puReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads, GE Healthcare Life Sciences) e 4µl de DNA.

A eletroforese em gel de agarose, visualização do gel e a purificação do DNA amplificado foi feita de acordo com a metodologia descrita previamente.

Para a sequenciação do gene da *SQLÉ*, a reação de PCR foi realizada num volume final de 10 µl e utilizou-se 2µl de cada *primer* a 10µM respectivamente, 3µl de água ultrapura, 1µl de BigDye® (ThermoFisher Scientific), 3µl do respectivo tampão e 1µl de DNA purificado, com as condições descritas na **Tabela 3.6**.

Tabela 3.6 - Condições de PCR utilizadas para a sequenciação do gene da *SQLÉ* para cada par de primers.

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	96°C	5 min	1x
Desnaturação Hibridação Extensão	96°C 50°C 60°C	10 seg 5 seg 4 min	30x
Extensão final	72°C	5 min	1x

3.5 Pesquisa de mutações no gene *SQLÉ*

Após sequenciação das cadeias *forward* e *reverse*, as sequências consenso foram obtidas com o programa Chromas Lite. Para fazer a pesquisa de mutações no gene da enzima *SQLÉ*, utilizaram-se as sequências obtidas através das PCRs de sequenciação com os *primers* F1 e R1 (numa primeira fase) e Drsq1 e Drsq2 (numa segunda fase). Para tal, utilizou-se o *software* MEGA7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0*). Este *software* foi utilizado para alinhar as sequências *consensus* dos isolados *T. rubrum* resistentes e alguns suscetíveis com uma sequência de referência de um isolado sensível *T. rubrum* (*GenBank*: [MG587093.2](#)) e com uma sequência de referência de um isolado resistente (*GenBank*: [Ay282412.1](#)). Em relação aos isolados de *T. interdigitale*, estes foram também comparados com uma sequência de referência de um isolado resistente (*GenBank*: [MH114933.1](#)) e outro suscetível (*GenBank*: [MN893286.1](#)).

3.6 Análise estatística

Toda a análise estatística dos dados clínicos utilizados neste estudo, foi realizada com recurso ao *software* IBM SPSS® versão 26.

4 Resultados

4.1 Caracterização da população amostrada

Neste estudo foram incluídos 164 isolados de dermatófitos. A caracterização da população de utentes dos quais se isolaram estes dermatófitos encontra-se apresentada na **Tabela Suplementar 1**. Dos 164 utentes, 54,3% (N=89) pertencem ao sexo masculino e 34,1% (N=56) ao sexo feminino, com idades compreendidas entre os 3 e 81 anos de idade. Em 11,6% dos casos (N=19), não nos foi possível obter os dados em relação ao género nem à idade.

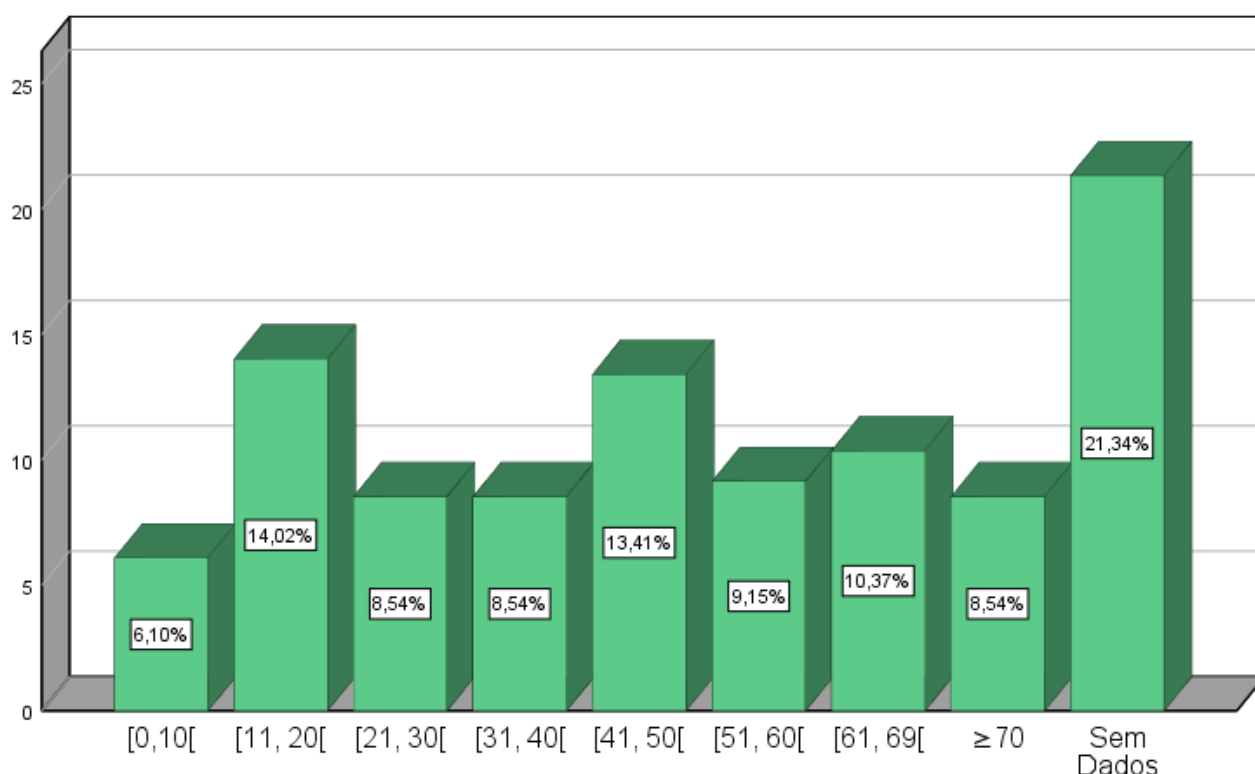


Figura 4.1 - - Representação gráfica das várias faixas etárias encontradas nos 164 isolados de *T. rubrum* e *T. interdigitale*.

As faixas etárias mais afetadas foram entre os 11 e os 20 anos de idade e entre os 41 e os 50 anos de idade, sendo que 7,9% (N=13) e 10,4% (N=17) correspondem ao sexo masculino, respetivamente, enquanto que 6,1% (N=10) e 3,0% (N=5) correspondem ao sexo feminino, respetivamente (**Figura 4.1**).

Unhas (N=129; 78,66%) e pele glabra (N=19; 11,59%) revelaram ser os tipos de amostra mais comuns em casos suspeitos de dermatofitose recebidos no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. (**Figura 4.2**).

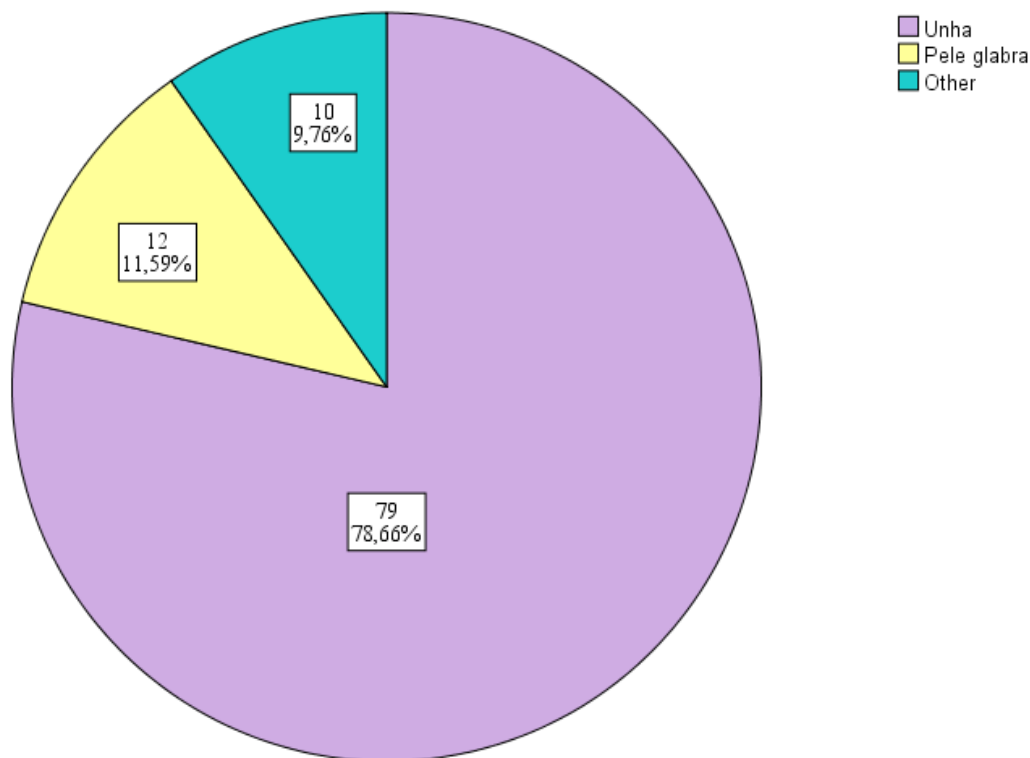


Figura 4.2 – Representação gráfica dos tipos de amostra biológica mais frequentemente recebidos no laboratório com presença de dermatofitose.

4.2 Caracterização dos isolados de *Trichophyton* através da técnica de PCR e MALDI-TOF

A identificação até à espécie dos 164 isolados de dermatófitos foi confirmada, inicialmente, através de MALDI-TOF com valores de confiança acima dos 99%. De seguida, os isolados resistentes e alguns isolados suscetíveis pertencentes às espécies *T. rubrum* e *T. interdigitale* foram sujeitos a PCR da região ITS e do gene da calmodulina, para confirmação da identificação prévia e para construção da árvore filogenética, e do gene da SQLE para pesquisa de mutações através da sequenciação do DNA. Foram estabelecidos como critérios de aceitação da qualidade das sequências, os parâmetros de *coverage* e homologia que foram simultaneamente iguais ou superiores a 98% de modo a garantir o seu poder discriminatório.

Inicialmente, foram apenas selecionados 147 isolados de *T. rubrum*. Adicionalmente, foram ainda estudados 17 isolados de *T. interdigitale*.

Dos 147 isolados de *T. rubrum*, não foi possível recuperar 45 isolados (27,4%) o que significa que apenas foram utilizados 102 isolados (viáveis) de *T. rubrum*. Obteve-se assim uma taxa de recuperação de 69,39% desta espécie, já da espécie *T. interdigitale* a taxa de recuperação foi de 100%.

4.3 Filogenia dos isolados *T. rubrum* e *T. interdigitale* estudados

Na **Figura 4.3** e na **Figura 4.4**, encontra-se representada, a título exemplificativo, a árvore filogenética construída com base na sequência do gene da calmodulina e da região ITS, respectivamente, de alguns isolados de ambas as espécies. Não foi possível incorporar a sequência do isolado nº59 da espécie *T. interdigitale* na árvore filogenética da região ITS por contaminação.

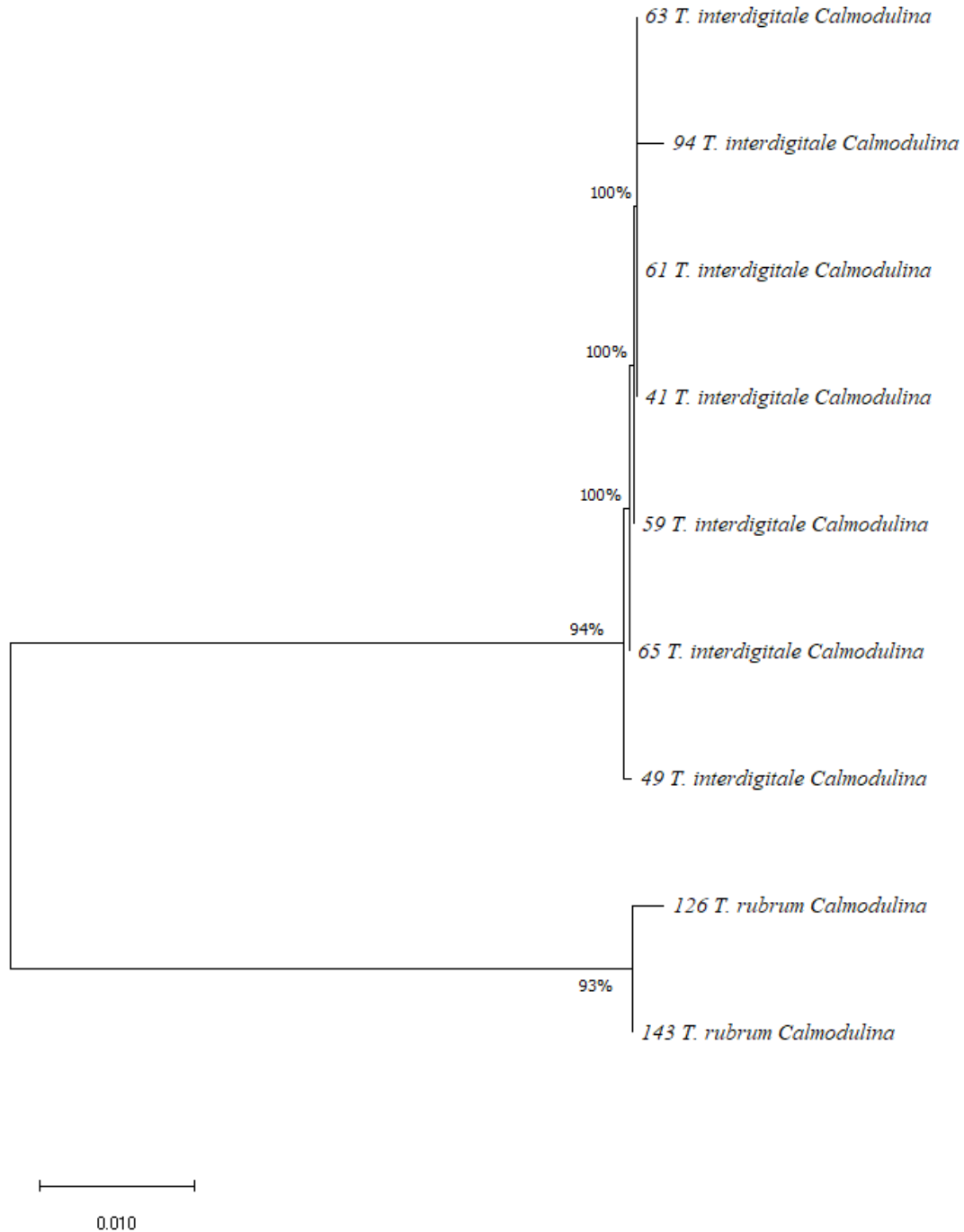


Figura 4.3 - Árvore filogenética obtida por *Neighbor-Joining* a partir das sequências do gene da calmodulina.

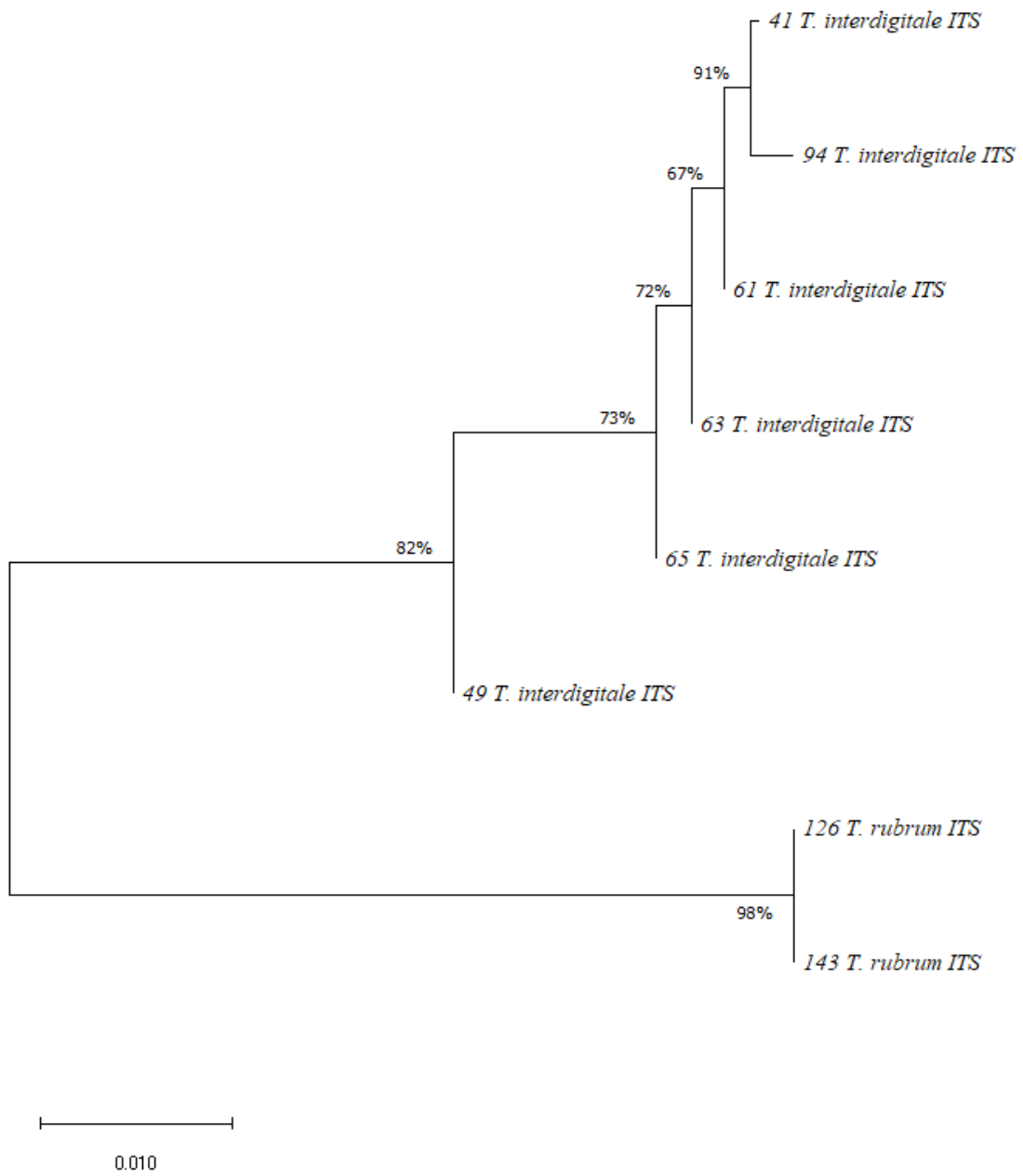


Figura 4.4 - Árvore filogenética obtida por *Neighbor-Joining* a partir das sequências da região ITS.

4.4 Testes de suscetibilidade à terbinafina

4.4.1 Pesquisa de isolados *T. rubrum* e *T. interdigitale* resistentes à terbinafina por meios *screening* de agar suplementado com terbinafina

Para detecção inicial de resistência à terbinafina e determinação da sua frequência, foram testados 102 isolados de *T. rubrum* e 17 isolados *T. interdigitale* provenientes das amostras clínicas. Foram observados os meios com as diferentes concentrações de antifúngico e o resultado categorizado como “+” com crescimento e “-“ sem crescimento.

Foi detetado um ($\approx 1\%$) isolado de *T. rubrum* (isolado n° 126) com crescimento acentuado em ambas as concentrações de antifúngico (0.06 mg/L e 0.125 mg/L) (**Erro! A origem da referência não foi encontrada.**) sugerindo assim ser resistente à terbinafina.

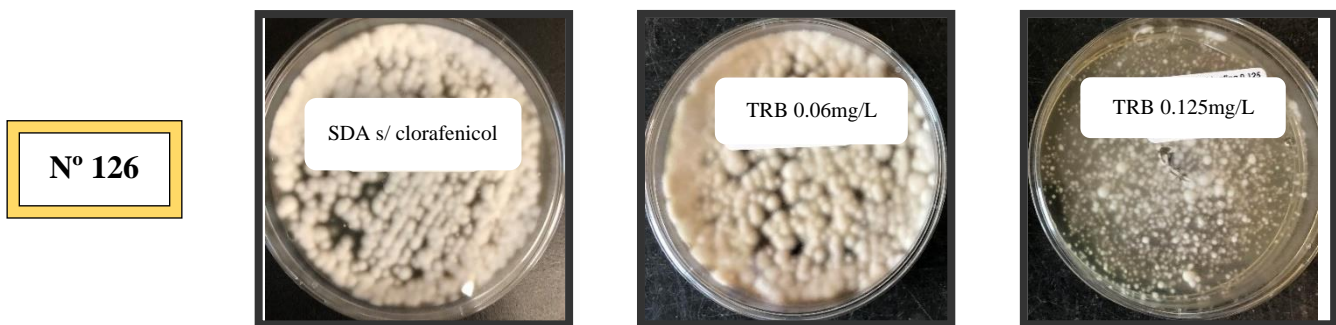
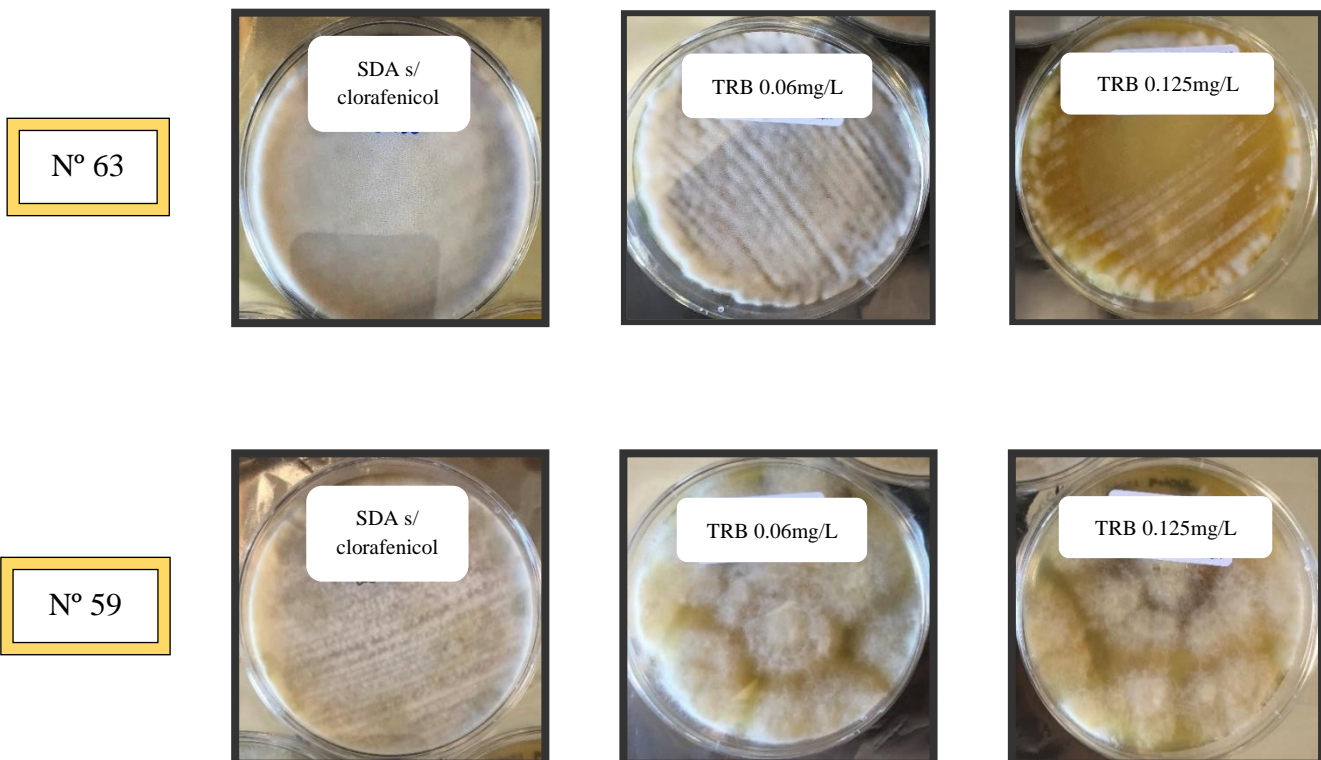


Figura 4.5 - Resultado do *screening* para o isolado *T. rubrum* N° 126.

Apesar de o estudo se focar principalmente na resistência de *T. rubrum* à terbinafina, paralelamente foi estudada a resistência de alguns isolados de *T. interdigitale*.

Neste estudo adicional, dos 17 isolados *T. interdigitale* testados, foram detetados 3 (1,83%) resistentes sendo eles os isolados n° 63, n° 59 e n° 94 (Figura 4.6). Os isolados referidos apresentaram um crescimento significativo em ambas as concentrações de antifúngico, pelo que sugerem ser resistentes à terbinafina.



Nº 94

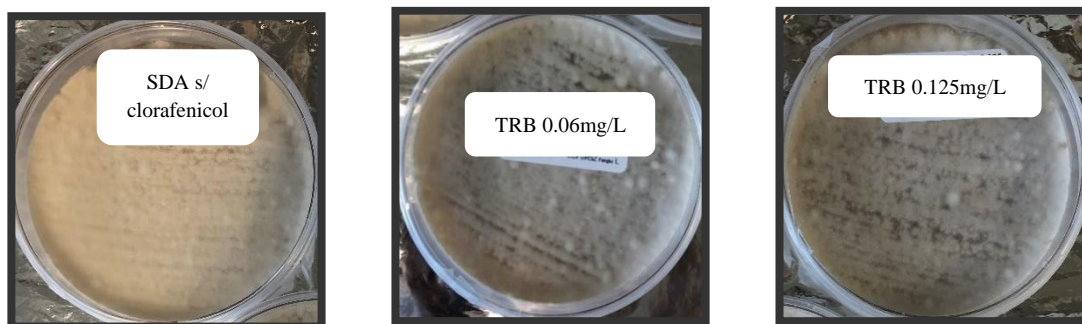


Figura 4.6 - Resultados dos screenings realizados aos isolados *T. interdigitale*.

4.4.2 Determinação da suscetibilidade à terbinafina pelo método de microdiluição em placa

No total foram realizadas 20 determinações do padrão de suscetibilidade à terbinafina pelo método de microdiluição em placa: foram analisados todos os isolados de *T. rubrum* e *T. interdigitale* (Tabela 4.1) considerados resistentes (por ter ocorrido crescimento no meio de screening) e também alguns suscetíveis.

Tabela 4.1 - Suscetibilidade ao antifúngico terbinafina dos isolados *T. rubrum* e *T. interdigitale* determinada através de microdiluição em caldo.

Isolado	Espécie	Screening		Microdiluições
		TRB		CMI (mg/L)
		<u>0.06 mg/L</u>	<u>0.125 mg/L</u>	<u>TRB</u>
126	<i>T. rubrum</i>	+	+	8
81	<i>T. rubrum</i>	-	-	0.5
80	<i>T. rubrum</i>	-	-	1
62	<i>T. rubrum</i>	-	-	1
68	<i>T. rubrum</i>	-	-	1
51	<i>T. rubrum</i>	-	-	0.25
49	<i>T. interdigitale</i>	-	-	0.25
59	<i>T. interdigitale</i>	+	+	1
32	<i>T. interdigitale</i>	-	-	0.25
63	<i>T. interdigitale</i>	+	+	> 8
9	<i>T. interdigitale</i>	-	-	0.0625
61	<i>T. interdigitale</i>	-	-	0.25
15	<i>T. interdigitale</i>	-	-	0.25
94	<i>T. interdigitale</i>	+	+	> 8
65	<i>T. interdigitale</i>	-	-	0.25

41	<i>T. interdigitale</i>	-	-	0.25
130	<i>T. interdigitale</i>	-	-	0.25
148	<i>T. interdigitale</i>	-	-	0.25
17	<i>T. interdigitale</i>	-	-	0.25
16	<i>T. interdigitale</i>	-	-	*

Legenda:

*Não foi possível determinar a CMI;

+ Com crescimento

- Sem crescimento

Com base na interpretação da **Tabela 4.1**, verifica-se uma concordância entre os dois métodos principalmente nos isolados resistentes, pelo que é possível concluir que o método de microdiluição corrobora os resultados obtidos pela metodologia de *screening* em agar: os isolados **126, 59, 63 e 94** são resistentes à terbinafina, com CMI de 8 mg/L, 1 mg/L e > 8 mg/L, respetivamente.

Todos os isolados que não cresceram nos meios de *screening*, foram considerados como suscetíveis à terbinafina ou como tendo uma baixa resistência ao antifúngico ⁵⁸.

Não foi possível determinar a CMI do isolado nº 16 devido a contaminação dos poços, pelo que esta estirpe não foi categorizada no que respeita ao seu padrão de suscetibilidade à terbinafina.

No geral, a frequência de resistência à terbinafina nos dermatófitos estudados foi de 2,44%. A frequência de resistência à terbinafina em *T. rubrum* foi de ≈1%, e em *T. interdigitale* de 1,83%.

4.5 Otimização e implementação da técnica PCR para amplificação e sequenciação do gene da SQLE para pesquisa de mutações que conferem resistência à terbinafina em *T. rubrum* e *T. interdigitale*

Tal como referido anteriormente, numa primeira fase, utilizou-se o par de *primers* F1/R1 para amplificação do gene da SQLE, com as condições descritas em Yamanda et al., 2017, acrescentando somente um ciclo de extensão final de 5 minutos a 72°C (**Tabela 4.2**).

Tabela 4.2 - Otimização das condições de PCR para amplificação do gene SQLE com os *primers* F1 e R1.

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 min	1x
Desnaturação	94°C	30 seg	30x
Hibridação	58°C	30 seg	
Extensão	72°C	45 seg	
Extensão final	72°C	5 min	1x

Porém, o tamanho do fragmento esperado (1600pb) ultrapassa o limite de leitura feita pelo sequenciador utilizado (até 700pb), não sendo a definição da sequência acima deste valor considerada fiável (**Figura 4.7**). Algumas das mutações (já descritas) que conferem resistência à terbinafina encontram-se acima dos 700 pb, pelo que não se utilizou este par de *primers* e foi decidida outra abordagem.

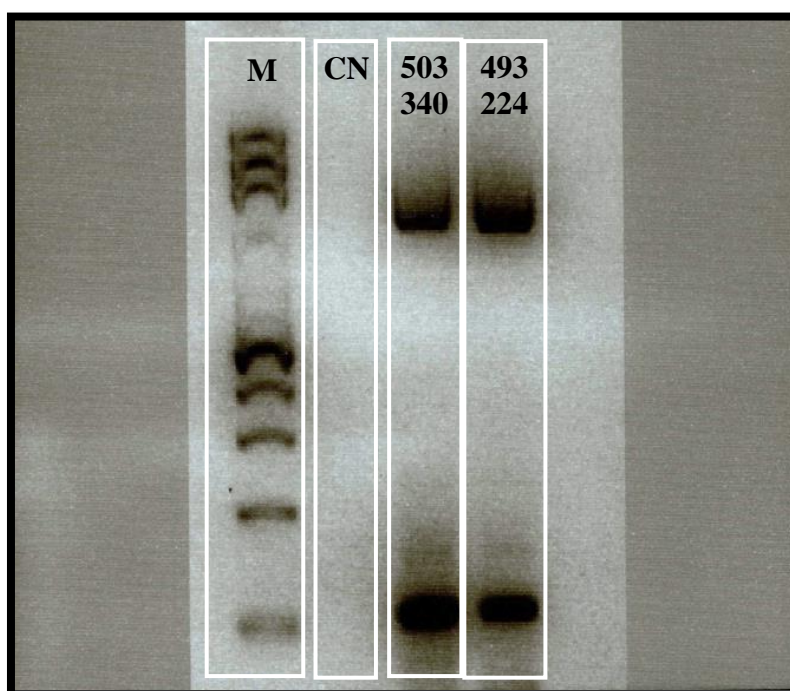


Figura 4.7 - Resultado da eletroforese em gel de agarose do produto da primeira PCR para amplificação do gene da SQLE com os primers F1 e R1.

Optou-se então por utilizar o par de *primers* Drsq1 e Drsq2, que amplificam a região onde já foram descritas mutações que conferem resistência à terbinafina e com um fragmento esperado de 520 pb. As condições utilizadas foram as que se encontram descritas em Salehi et al., 2018, acrescentando unicamente um ciclo de extensão final de 7 minutos a 72°C (**Tabela 4.3**).

Tabela 4.3 - Otimização das condições de PCR para amplificação do gene SQLE com os *primers* Drsq1 e Drsq2.

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 min	1x
Desnaturação	95°C	30 seg	34x
Hibridação	60°C	30 seg	
Extensão	72°C	3 min	
Extensão final	72°C	7 min	1x

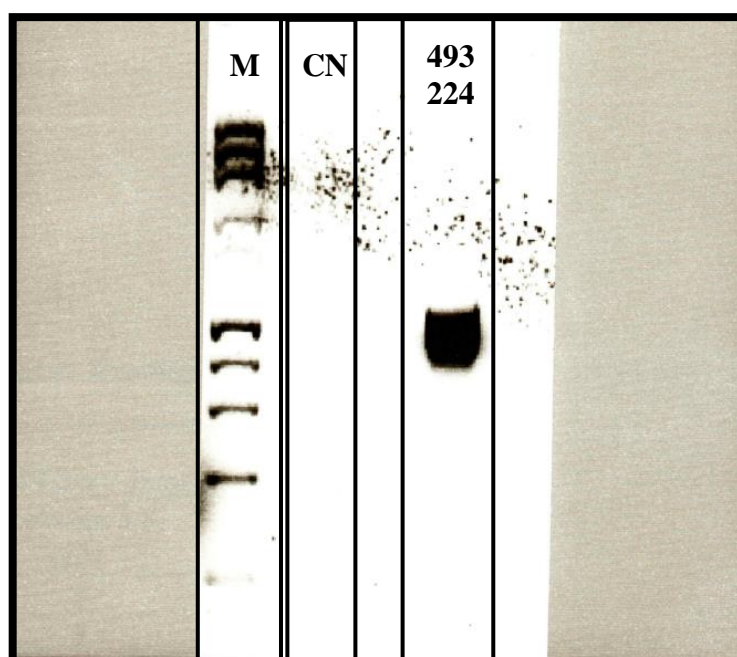


Figura 4.8 - Resultado da eletroforese em gel de agarose do produto da última PCR para amplificação do gene da SQLE com os *primers* Drsq1 e Drsq2.

Ao utilizar o par de *primers* Drsq1 e Drsq2 com as condições de amplificação descritas na **Tabela 4.3** e de sequenciação enunciadas na **Tabela 3.6**, foi possível obter uma banda nítida e do tamanho esperado (**Figura 4.8**), o que levou a que estas condições fossem consideradas ideais na amplificação e sequenciação do gene alvo sendo por isso, aplicadas nos restantes isolados.

terbinafina. Destes 164 isolados, 54,3% (N=89) pertencem ao sexo masculino o que vai de acordo com vários estudos realizados em todo o mundo onde se verifica uma maior prevalência de dermatofitoses no sexo masculino^{9,37,40,66,70,73,74}. A idade média dos indivíduos foi de 40,7 anos o que também vai de encontro com estudos anteriores onde demonstram haver uma maior prevalência de pé de atleta e onicomicose na faixa etária entre os 21-50 anos de idade. No presente estudo, a faixa etária com maior prevalência destas patologias foi entre os 11-20 anos de idade (14,02%), seguida da faixa etária entre os 41-50 anos de idade (13,41%). Apesar de o envelhecimento da população ser um dos fatores de risco para o aparecimento deste tipo de infeções, principalmente em ambiente ocupacional, cada vez é mais frequente nos dias de hoje as crianças/jovens adultos participarem em atividades extracurriculares, principalmente atividades que envolvam exercício físico, o que pode levar a uma maior exposição a este tipo de infeções por dermatófitos, no entanto, a transmissão entre membros da família continua a ser mais comum do que a transmissão horizontal^{10,66,75}.

Do total de 164 isolados, apenas foi possível recuperar 102 isolados pertencentes à espécie *T. rubrum* pelo que demonstrou uma fraca viabilidade da cultura quando recuperada do stock congelado enquanto que todos os isolados da espécie *T. interdigitale* (N=17) foram recuperados na sua totalidade. A aplicação da técnica MALDI-TOF, seguida da confirmação através de técnicas de biologia molecular, a estes 119 isolados, permitiram uma correta identificação dos isolados o que comprova a eficácia e sensibilidade de cada metodologia sendo por isso recomendadas para a identificação e discriminação de espécies dentro do género *Trichophyton*. Contudo, é necessário ter em conta os pares de primers a utilizar na identificação molecular das espécies do género *Trichophyton*. No presente estudo, tanto a sequenciação da região ITS como a sequenciação do gene da calmodulina com o par de primers ITS1/ITS4 e cmd5/cmd6, respetivamente, permitiram obter um poder discriminatório elevado e por essa razão, a sua utilização foi validada.

No que diz respeito às árvores filogenéticas, tanto para as sequências do gene da calmodulina (**Figura 4.3**) tanto para as sequências da região ITS (**Figura 4.4**), foi possível obter uma clara identificação e distinção entre ambas as espécies, com *bootstrap values* $\geq 93\%$ para o gene da calmodulina e uma maior discrepância nos valores registados para a região ITS. Para os isolados analisados verificou-se que quer a sequenciação da região ITS quer a sequenciação parcial do gene da calmodulina permitiram a identificação correta da espécie, ambas com identificações concordantes. No entanto, de acordo com a análise de *Neighbor-joining* efetuada aos isolados, a sequenciação ITS parece permitir maior discriminação entre os isolados.

Como principal objetivo deste estudo pretendeu-se avaliar a resistência de *T. rubrum* à terbinafina, antifúngico de eleição no tratamento de pé de atleta e onicomicose. Para além de todos os fatores já mencionados, o extenso período temporal de terapêutica (e por isso muitas vezes a falha de compromisso com a mesma) e a falta de diagnóstico correto, tem feito com que casos de resistência aos antifúngicos pelos dermatófitos sejam notificados em todo o mundo, tendo já sido reportados vários casos na Europa e estima-se que estejam subvalorizados e que continuem a aumentar^{44,51,58,68,69}. A caracterização dos padrões de suscetibilidade ao antifúngico terbinafina foi feita recorrendo aos meios de *screening* de agar suplementado com terbinafina e ao método das microdiluições em caldo, que embora sejam metodologias diferentes, são complementares uma da outra.

O uso dos meios de *screening* é uma metodologia comum a laboratórios onde é feito o estudo de suscetibilidade a antifúngicos pois, permite fazer uma triagem de possíveis isolados resistentes e suscetíveis. É uma técnica de fácil execução e pouco dispendiosa, mas é um método moroso principalmente no estudo de dermatófitos pelo seu tempo de crescimento demorado o que pode levar

também a uma maior probabilidade de contaminação dos meios. Por outro lado, as microdiluições em caldo são um método mais rigoroso e preciso pois, permitem uma correta definição de quais os isolados resistentes e quais os isolados suscetíveis, sendo por isso indispensável na caracterização de padrões de suscetibilidade. Assim, de acordo com os resultados obtidos pelo método de *screening*, 2.44% dos isolados foram considerados resistentes. De acordo com a metodologia das microdiluições, uma maior percentagem dos isolados testados apresentaram resistência à terbinafina, de acordo com os valores propostos num estudo recente ⁵⁸. No entanto, todos os isolados do nosso estudo foram testados pelo método de *screening* enquanto que apenas alguns foram testados pelo método das microdiluições (todos os considerados resistentes e alguns considerados como sensíveis no meio *screening*). Foi possível selecionar por meio de *screening* de agar suplementado com terbinafina, um único isolado resistente *T. rubrum* numa amostra total de 102 isolados e três isolados resistentes *T. interdigitale* numa amostra total de 17 isolados, em ambas as concentrações utilizadas definidas pela norma EUCAST (0.06 mg/L e 0.125 mg/L)⁵⁸ com CMIs posteriormente confirmadas por microdiluição seguindo as normas do CLSI ⁶⁵. Os nossos resultados demonstraram que o isolado nº126 *T. rubrum* revelou ser bastante resistente à terbinafina com uma CMI de 8 mg/L. Os isolados de *T. interdigitale* nº 63 e nº 94 apresentaram CMIs superiores a 8mg/L, o que indica uma baixa suscetibilidade à terbinafina; o isolado de *T. interdigitale* nº 59 apresentou uma CMI igual a 1 mg/L o que sugere uma resistência moderada à terbinafina, de acordo com os parâmetros definidos pelo estudo de Saunte et al.⁵⁸. Todos os isolados com resistência marcada à terbinafina foram detetados por utilização dos meios de *screening*. A maior parte dos isolados considerados com baixa resistência à terbinafina foram os que apresentaram uma MIC de 0.25 mg/L. O método das microdiluições apresenta uma gama de erro da determinação das MICs, que pode ir de 1 a 2 diluições. Assim, o real valor de MIC poderá ser de facto menor que 0.25 mg/L; uma diluição a menos será 0.125 mg/L, o que está de acordo com os resultados obtidos pelo método de *screening*. Verificou-se assim, uma complementaridade de métodos. Este estudo e os dados obtidos permitiram a implementação e aplicação da metodologia de *screening* de agar suplementado com terbinafina na rotina clínica do Laboratório Nacional de Referência de Infecções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Já foi demonstrado que o mecanismo de resistência à terbinafina mais frequente nos dermatófitos está relacionado com mutações pontuais em uma das quatro posições (L393, F397, F415 e H440) da proteína da SQLE. Recentemente, Yamada et al.⁴⁴, demonstrou uma taxa de resistência à terbinafina de 1% que incluía maioritariamente isolados pertencentes à espécie *T. rubrum* (N=16) e apenas um isolado pertencente à espécie *T. interdigitale* que foi considerado como resistente à terbinafina com uma CMI de 3.2 µg/mL e que continha a substituição F397L na proteína codificada pela SQLE. Mais tarde, Singh et al.⁵⁶, reportou 20 isolados *T. interdigitale* num total de 63, com uma taxa elevada de resistência à terbinafina (32%) com CMIs entre os 4 a ≥ 32 µg/mL, onde 12 dos 20 isolados *T. interdigitale* resistentes apresentaram a mesma substituição F397L na proteína da SQLE que o isolado *T. interdigitale* descrito no trabalho de Yamada et al.⁴⁴ e onde foi detetada, pela primeira vez, a substituição L393F nos restantes 8 isolados *T. interdigitale* resistentes ⁵⁶. Ambas as substituições também conferem o fenótipo resistente em *T. rubrum*.

Neste estudo, a otimização da PCR e sequenciação do gene da SQLE de *T. rubrum* e *T. interdigitale* permitiu a deteção de mutações pontuais em apenas um isolado de cada espécie num total de quatro resistentes. Após análise da sequência do gene da SQLE, o isolado *T. rubrum* nº126 apresentou uma mutação pontual na posição 1189 na ORF do gene da SQLE o que corresponde a uma substituição de uma fenilalanina na posição 397 da sequência de aminoácidos da proteína por uma isoleucina. Apesar de as substituições mais comuns e que levam a uma maior resistência à terbinafina serem as variantes L393F e F397L, a substituição F397I presente no isolado *T. rubrum* deste estudo, revelou provocar

uma elevada resistência à terbinafina, apresentando este isolado uma CMI de 8 mg/L. Este isolado foi obtido através de cultura uma amostra de unha onde a probabilidade de reinfeção e de aquisição de resistência por parte do agente etiológico é maior, uma vez que a infeção pode estar situada em locais mais profundos da unha e o antifúngico por via tópica não consegue atuar nesse local específico.

Relativamente aos isolados resistentes *T. interdigitale*, apenas o isolado nº 94 apresentou uma mutação pontual na posição 1189 na ORF do gene da SQLE o que levou a uma substituição de uma fenilalanina na posição 397 da sequência de aminoácidos da proteína por uma leucina, o que confirma a sua CMI superior a 8 mg/L.

Apesar de a maior parte das vezes a resistência dos dermatófitos estar associada a mutações pontuais no gene que codifica a SQLE, existem outros mecanismos que podem contribuir para a diminuição da suscetibilidade a este antifúngico. Segundo o estudo de Santos et al., 2018, a sobre-expressão do gene *salA* que codifica a enzima salicilato 1-monooxigenase que está envolvida na via de degradação da molécula de naftaleno, parece estar relacionada com a resistência de *T. rubrum* à terbinafina, uma vez que a terbinafina contém na sua estrutura molecular naftaleno e ao haver uma sobre-expressão do gene *salA* e a degradação do naftaleno presente na terbinafina, este gene vai ser responsável pela aquisição de resistência à terbinafina por *T. rubrum*⁷⁶. Outros mecanismos envolvendo bombas de efluxo e a elevada expressão de certos transportadores também parecem contribuir para uma baixa suscetibilidade a este ou outros antifúngicos^{7,48}.

Existem vários possíveis motivos para justificar a resistência à terbinafina nos isolados *T. interdigitale* nº 63 e nº 59 pertencentes, mesmo sem se ter verificado a presença de mutações pontuais nas regiões esperadas. Uma das hipóteses, baseia-se no facto de que foi feita apenas a sequenciação parcial do gene da SQLE e por isso é possível que, mesmo que exista uma outra mutação pontual, a mesma não seja detetada uma vez que pode estar presente noutra região desse mesmo gene. Seria interessante, neste ponto de vista, uma sequenciação total do gene da SQLE para verificar se está presente ou não, uma mutação nesse gene. O uso de vários pares de *primers* que permitam amplificar diferentes regiões do gene, e consequentemente, permitam fazer uma sequência consenso que cubra todo o gene, poderá ser uma solução para ultrapassar as limitações técnicas do sequenciador.

Outra hipótese possível, reside na existência de outros mecanismos de resistência, como anteriormente mencionado para *T. rubrum*.

A taxa frequência de resistência à terbinafina encontrada em Portugal a partir deste estudo, não é muito díspar das que já foram descritas noutros países onde já foram reportados casos de resistência à terbinafina por parte de *T. rubrum* e *T. interdigitale*. A frequência de resistência detetada em Portugal (2,44%) sugere ser superior à frequência de resistência já descrita em países europeus como a Suíça através do estudo de Yamada et al.⁴⁴ (~1%).

No entanto, é no continente asiático que se registam as maiores frequências de resistência à terbinafina, principalmente em isolados de *T. interdigitale*. Segundo o estudo mais recente realizado por Singh et al.⁵⁶, a frequência de resistência descrita para a espécie *T. interdigitale* foi de 32% com CMIs entre os 4 e ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ sendo que, os isolados com a substituição F397L foram os que apresentaram, na maioria dos casos, CMI superiores a 32 $\mu\text{g/mL}$. No Irão, foi descrita uma frequência de resistência de 2% para isolados *T. rubrum* com a substituição L393F.

Parece ser unânime que a frequência de casos de resistência à terbinafina por parte de *T. rubrum* e *T. interdigitale* está a aumentar na Europa e Portugal não é exceção o que demonstra que é necessário

incluir na rotina clínica dos laboratórios, a realização de testes de suscetibilidade ao antifúngico e a pesquisa de mutações a ele associadas.

Embora esta análise retrospectiva tenha algumas limitações, nomeadamente o número reduzido de amostras totais e a carência de apreciação do histórico clínico e do seu prognóstico, foi o primeiro estudo realizado em Portugal onde foi feita a caracterização de suscetibilidade à terbinafina em dermatófitos, quer em termos fenotípicos, quer com deteção de mutações que conferem resistência a este antifúngico.

6 Conclusões e Perspetivas Futuras

Com este estudo, foi possível efetuar uma caracterização da população amostrada, das amostras biológicas e dos isolados do género *Trichophyton* obtidos por cultura destas amostras. Estes isolados foram caracterizados através de tecnologias moleculares e também com recurso a espectroscopia de massa (MALDI-TOF). Foi também possível detetar, pela primeira vez (que tenhamos conhecimento), isolados do género *Trichophyton* resistentes à terbinafina em Portugal. A resistência à terbinafina por parte de *T. rubrum* e *T. interdigitale* é um problema real em todo o mundo e estima-se que os casos continuem em aumentar e por isso acreditamos que, a aplicação do método de *screening* e das microdiluições bem como a implementação da reação de PCR para pesquisa de mutações que conferem essa mesma resistência será uma mais valia e um contributo importante no que toca ao diagnóstico e posterior terapia das dermatofitoses reportadas em Portugal.

7 Bibliografia

1. Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. *Brock Biology of Microorganisms*. 14th ed. Pearson Education, Inc.; 2015.
2. Wu B, Hussain M, Zhang W, Stadler M, Liu X. Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. *Mycology*. 2019;10(3):127-140. doi:10.1080/21501203.2019.1614106
3. Hawksworth DL, Lücking R. Fungal Diversity Revisited : 2 . 2 to 3 . 8 Million Species. *Microbiol Spectr*. 2017;5(4):1-17. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.Correspondence
4. Benedict K, Richardson M, Vallabhaneni S, Jackson BR, Chiller T. Emerging issues, challenges, and changing epidemiology of fungal disease outbreaks. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(12):1-18. doi:10.1016/S1473-3099(17)30443-7.Emerging
5. Pai V, Ganavalli A, Kikkeri NN. Antifungal Resistance in Dermatology Pathogenesis of Fungal Infections. 2020;63(5):361-368. doi:10.4103/ijd.IJD
6. Fund GA, Infections F, Report G. Stop neglecting fungi. 2017;(July). doi:10.1038/nmicrobiol.2017.120
7. Rossi A. Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. 2008:369-383. doi:10.1007/s11046-008-9110-7
8. Brown GD, Brown GD, Denning DW, et al. Hidden Killers : Human Fungal Infections. *Med Mycol*. 2012;4(165):1-9. doi:10.1126/scitranslmed.3004404
9. Lopes AI, Tavaría FK, Pintado ME. Conventional and natural compounds for the treatment of dermatophytosis. *Med Mycol*. 2019;00(00):1-14. doi:10.1093/mmy/myz116
10. Hayette M, Sacheli R. Dermatophytosis , Trends in Epidemiology and Diagnostic Approach. *Curr Fungal Infect Rep*. 2015. doi:10.1007/s12281-015-0231-4
11. Hay RJ. *Subcutaneous Mycoses : General Principles*. Tenth Edit. Elsevier Inc.; 2020. doi:10.1016/B978-0-323-55512-8.00083-1
12. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases — Estimate Precision. *J Fungi*. 2017;3(57). doi:10.3390/jof3040057
13. Education LIF. LIFE Worldwide. <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases/pneumocystis-pneumonia>. Accessed November 5, 2020.
14. Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, et al. Emerging fungal threats to animal , plant and ecosystem health. *Nature*. 2012;484:186-194. doi:10.1038/nature10947
15. Sabino R, Veríssimo C, Brandão J, et al. Serious fungal infections in Portugal. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017. doi:10.1007/s10096-017-2930-y
16. Education LIF. LIFE Worldwide. <http://life-worldwide.org/fungal-diseases/cryptococcal-meningitis>. Accessed November 5, 2020.
17. Education LIF. LIFE Worldwide. <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases/dimorphic-fungi>. Accessed November 5, 2020.
18. Zhan P, Liu W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide. *Mycopathologia*. 2016. doi:10.1007/s11046-016-0082-8

19. Rouzaud C, Hay R, Chosidow O, et al. Severe Dermatophytosis and Acquired or Innate Immunodeficiency : A Review. *J Fungi*. 2016;2(4). doi:10.3390/jof2010004
20. Ahmadi B, Mirhendi H, Makimura K, et al. Phylogenetic analysis of dermatophyte species using DNA sequence polymorphism in calmodulin gene. *Med Mycol*. 2016;54(February):500-514. doi:10.1093/mmy/myw004
21. Hoog GS De, Dukik K, Monod M, et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*. 2016. doi:10.1007/s11046-016-0073-9
22. Zhan P, Dukik K, Li D, et al. Phylogeny of dermatophytes with genomic character evaluation of clinically distinct *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. *Stud Mycol*. 2018;89:153-175. doi:10.1016/j.simyco.2018.02.004
23. Faway É, Lambert C, Yves DR. In vitro models of dermatophyte infection to investigate epidermal barrier alterations. *Exp Dermatol*. 2018;27:915-922. doi:10.1111/exd.13726
24. Monod M, Bruno M. Recent Findings in Onychomycosis and Their Application for Appropriate Treatment. *J Fungi*. 2019;5:20. doi:10.3390/jof5010020
25. Su H, Packeu A, Ahmed SA, Al-hatmi AMS, Blechert O. crossm Species Distinction in the *Trichophyton rubrum* Complex. 2019;57(9):1-14.
26. Kuijpers AFA, Presber W, Gra Y. Molecular Taxonomy of the *Trichophyton rubrum* Complex. 2000;38(9):3329-3336.
27. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. 2012;109(16):6241-6246. doi:10.1073/pnas.1117018109
28. Rezaei-matehkolaei A, Mirhendi H, Makimura K, et al. Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes. 2014;(July):674-688. doi:10.1093/mmy/myu033
29. Mirhendi H, Makimura K, Hoog GS De, et al. Translation elongation factor 1- α gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. 2014:1-10. doi:10.1093/mmy/myu088
30. Packeu A, Stubbe D, Roesems S, Goens K, Rooij P Van. Lineages Within the *Trichophyton rubrum* Complex. *Mycopathologia*. 2020;185(1):123-136. doi:10.1007/s11046-019-00386-z
31. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology*. Lea & Febiger; 1992.
32. Adelaide U of. *Trichophyton* _ Mycology Online. <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/trichophyton/>. Accessed April 3, 2020.
33. Peres NTA, Rossi A. Pathogenesis of Dermatophytosis : Sensing the Host Tissue. *Mycopathologia*. 2017;182(1):215-227. doi:10.1007/s11046-016-0057-9
34. Martinez-rossi NM, Bitencourt TA, Peres NTA, Lang EAS. Dermatophyte Resistance to Antifungal Drugs : Mechanisms and Prospectus. *Front Med*. 2018;9(1108):1-18. doi:10.3389/fmicb.2018.01108
35. Brasch J. Pathogenesis of tinea. 2010;2010(Table 1):780-786. doi:10.1111/j.1610-0387.2010.07481.x
36. Baldo A, Monod M, Mathy A, et al. Mechanisms of skin adherence and invasion by

- dermatophytes. 2012;55:218-223. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02081.x
37. Ilkit M, Durdu M. Tinea pedis : The etiology and global epidemiology of a common fungal infection. *Crit Rev Microbiol*. 2015;41(3):374-388. doi:10.3109/1040841X.2013.856853
 38. Ludivine MH, Laurence C, Bernard F. Are Th17 Cells Playing a Role in Immunity to Dermatophytosis ? *Mycopathologia*. 2017;182(1):251-261. doi:10.1007/s11046-016-0093-5
 39. Reiss E. Superficial mycoses. <https://www.microbiologybook.org/mycology/2018mycology-4.htm>. Accessed April 5, 2020.
 40. Piraccini BM, Alessandrini A. Onychomycosis : A Review. 2015:30-43. doi:10.3390/jof1010030
 41. Welsh O, Vera-cabrera L, Welsh E. Onychomycosis. 2010:151-159. doi:10.1016/j.clindermatol.2009.12.006
 42. Ghannoum M, Isham N. Fungal Nail Infections (Onychomycosis): A Never-Ending. 2014;10(6). doi:10.1371/journal.ppat.1004105
 43. Rato M, Costin A, Furtado C, Sousa C, Toscano C, Veríssimo C. Epidemiologia das Infecções Fúngicas Superficiais em Portugal : Revisão de 3 Anos (2014-2016). *Soc Port Dermatologia e Venereol*. 2018;76(May):269-278.
 44. Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, et al. Terbinafine Resistance of Trichophyton Clinical Isolates Caused by Specific Point Mutations in the Squalene Epoxidase Gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(7):1-13.
 45. Gupta AK, Foley KA, Versteeg SG. New Antifungal Agents and New Formulations Against Dermatophytes. *Mycopathologia*. 2016. doi:10.1007/s11046-016-0045-0
 46. Sanglard D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. *Front Med*. 2016;3(11):1-10. doi:10.3389/fmed.2016.00011
 47. David E. Golan, Armen H. Tashjian, Jr., Ehrin J. Armstrong AWA. *Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica Da Farmacoterapia*. 2ª edição.
 48. Khurana A, Sardana K, Chowdhary A. Antifungal resistance in dermatophytes : Recent trends and therapeutic implications. *Fungal Genet Biol*. 2019;132(July):103255. doi:10.1016/j.fgb.2019.103255
 49. Rudramurthy SM, Shankarnarayan SA, Dogra S, et al. Mutation in the Squalene Epoxidase Gene of Trichophyton interdigitale and Trichophyton rubrum Associated with Allylamine Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(5):1-9.
 50. Antonella DA, Roberto T. Tinea Unguium : Diagnosis and Treatment in Practice. *Mycopathologia*. 2017;182(1):95-100. doi:10.1007/s11046-016-0078-4
 51. Ghelardi E, Celandroni F, Gueye A, et al. Potential of Ergosterol Synthesis Inhibitors To Cause Resistance or Cross-Resistance in Trichophyton rubrum. 2014;58(5):2825-2829. doi:10.1128/AAC.02382-13
 52. Osborne CS, Leitner I, Hofbauer B, Fielding CA, Favre B, Ryder NS. Biological , Biochemical , and Molecular Characterization of a New Clinical Trichophyton rubrum Isolate Resistant to Terbinafine. 2006;50(6):2234-2236. doi:10.1128/AAC.01600-05
 53. Mukherjee PK, Leidich SD, Isham N, Leitner I, Ryder NS, Ghannoum MA. Clinical Trichophyton rubrum Strain Exhibiting Primary Resistance to Terbinafine. 2003;47(1):82-86.

doi:10.1128/AAC.47.1.82

54. Osborne CS, Leitner I, Favre B, Ryder NS. Amino Acid Substitution in Trichophyton rubrum Squalene Epoxidase Associated with Resistance to Terbinafine. 2005;49(7):2840-2844. doi:10.1128/AAC.49.7.2840
55. Favre B, Ghannoum MA, Ryder NS. Biochemical characterization of terbinafine-resistant Trichophyton rubrum isolates. 2004;(December):525-529. doi:10.1080/13693780410001661482
56. Singh A, Masih A, Khurana A, et al. High terbinafine resistance in Trichophyton interdigitale isolates in Delhi , India harbouring mutations in the Squalene epoxidase (SQLE) gene. *Mycoses*. 2018;(March):477-484. doi:10.1111/myc.12772
57. Rocha EMF, Gardiner RE, Park S, Perlin DS. A Phe389Leu Substitution in ErgA Confers Terbinafine Resistance in Aspergillus fumigatus. 2006;50(7):2533-2536. doi:10.1128/AAC.00187-06
58. Ditte M.L. Saunte, Rasmus K. Hare, Karin M. Jørgensen, Rene Jørgensen M, Deleuran, Claus O. Zachariae, Simon F. Thomsen, Lars Bjørnskov-Halkier K, Kofoed MCA. Emerging terbinafine resistance in Trichophyton: clinical characteristics, squalene epoxidase gene mutations and a reliable EUCAST method for detection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;(August). doi:10.1128/AAC.01126-19
59. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. <https://www.eucast.org>. Accessed October 13, 2020.
60. Chaya AK, Pande S. Methods of specimen collection for diagnosis of superficial and subcutaneous fungal infections. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2007;73(3):202-205.
61. Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clin Chem*. 2015;61(1):1-12. doi:10.1373/clinchem.2014.221770
62. Nenoff P, Erhard M, Simon JANC, et al. MALDI-TOF mass spectrometry – a rapid method for the identification of dermatophyte species. *Med Mycol*. 2013;(January):17-24. doi:10.3109/13693786.2012.685186
63. L'Ollivier C, Ranque S. MALDI-TOF-Based Dermatophyte Identification. *Mycopathologia*. 2016. doi:10.1007/s11046-016-0080-x
64. bioMérieux. bioMérieux Portugal. <https://www.biomerieux.pt/produto/vitekr-ms-0>.
65. M38 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing for Filamentous Fungi. 2015;(December).
66. Dabas Y, Xess I, Singh G, Pandey M, Meena S. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility Patterns of Clinical Dermatophytes Following CLSI and EUCAST Guidelines. *J Fungi*. 2017;3(17). doi:10.3390/jof3020017
67. Rodrigues C, Mota A, Miranda KC, et al. Comparison of in vitro activity of five antifungal agents against dermatophytes , using the agar dilution and broth microdilution methods Comparação da atividade in vitro de cinco agentes antifúngicos para dermatófitos , usando os métodos de diluição em ágar e microdiluição em caldo. 2009;42(3):250-254.
68. Khurana A, Masih A, Chowdhary A, et al. Correlation of In Vitro Susceptibility Based on MICs and Squalene Epoxidase Mutations with Clinical Response to Terbinafine in Patients with Tinea Corporis/Cruris. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(12):1-9.

69. Salehi Z, Shams-ghahfarokhi M, Razzaghi-abyaneh M. Antifungal drug susceptibility profile of clinically important dermatophytes and determination of point mutations in terbinafine-resistant isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;12-15.
70. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008;51:2-15.
71. Gnat S, Nowakiewicz A, Łagowski D, Zięba P. Host- and pathogen-dependent susceptibility and predisposition to dermatophytosis. *J Med Microbiol*. 2019;68:823-836. doi:10.1099/jmm.0.000982
72. Silva GS, Rosenbach M. Climate change and dermatology : An introduction to a special topic , for this special issue. *Int J Women's Dermatology*. 2021;7(1):3-7. doi:10.1016/j.ijwd.2020.08.002
73. Drakensjö IT, Chryssanthou E. Epidemiology of dermatophyte infections in Stockholm , Sweden : a retrospective study from 2005 – 2009. 2011;(October 2010):484-488. doi:10.3109/13693786.2010.540045
74. Svejgaard EL, Nilsson J. Onychomycosis in Denmark : prevalence of fungal nail infection in general practice Onychomykosen in Da " nemark : Die Ha " ufigkeit von Nagelmykosen in der Allgemeinpraxis. 2004;(May 2003):131-135.
75. Nenoff P, Ginter- G. Mycology – an update . Part 1 : Dermatomycoses : Causative agents , epidemiology and pathogenesis. 2014:188-210. doi:10.1111/ddg.12245
76. Santos HL, Lang EAS, Segato F, Rossi A, Martinez-rossi NM. Terbinafine resistance conferred by multiple copies of the salicylate 1-monooxygenase gene in *Trichophyton rubrum*. *Med Mycol*. 2018:378-381. doi:10.1093/mmy/myx044

8 Material Suplementar

Tabela Suplementar 1 - Características clínicas gerais dos 164 isolados clínicos com dermatofitose.

Identificação do isolado	Espécie	Amostra	Género	Idade
1	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	7
2	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	12
3	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	59
4	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	SD
5	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	52
6	<i>T. rubrum</i>	Unha	SD	SD
7	<i>T. rubrum</i>	Unha	SD	SD
8	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	26
9	<i>T. interdigitale</i>	Unha	M	52

10	<i>T. interdigitale</i>	Pele glabra	F	7
11	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	SD
12	<i>T. rubrum</i>	Pele da face	F	29
13	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	46
14	<i>T. rubrum</i>	Pele glabra	F	15
15	<i>T. interdigitale</i>	Unha	SD	SD
16	<i>T. interdigitale</i>	Unha	SD	SD
17	<i>T. interdigitale</i>	Unha	F	74
18	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	43
19	<i>T. rubrum</i>	Unha	SD	SD
20	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	15
21	<i>T. rubrum</i>	Pele do tronco	M	42
22	<i>T. rubrum</i>	Pele glabra	F	27
23	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	47
24	<i>T. rubrum</i>	Pele do tronco	M	79
25	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	4
26	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	42
27	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	37
28	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	SD
29	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	67
30	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	19
31	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	42
32	<i>T. interdigitale</i>	Unha	F	24
33	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	19
34	<i>T. rubrum</i>	Pele glabra	F	16
35	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	43
36	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	28
37	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	65
38	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	15

39	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	12
40	<i>T. rubrum</i>	Pele glabra	F	37
41	<i>T. interdigitale</i>	Unha	M	68
42	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	9
43	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	70
44	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	71
45	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	3
46	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	48
47	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	5
48	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	71
49	<i>T. interdigitale</i>	Unha	M	81
50	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	42
51	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	3
52	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	26
53	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	49
54	<i>T. rubrum</i>	Pele glabra	M	70
55	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	57
56	<i>T. rubrum</i>	Pele da virilha	F	SD
57	<i>T. rubrum</i>	Pele do tronco	M	30
58	<i>T. interdigitale</i>	Unha	F	54
59	<i>T. interdigitale</i>	Unha	SD	SD
60	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	53
61	<i>T. interdigitale</i>	Unha	F	53
62	<i>T. rubrum</i>	Unha e pele glabra	M	SD
63	<i>T. interdigitale</i>	Unha	M	66
64	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	14
65	<i>T. interdigitale</i>	Unha	F	50
66	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	SD

67	<i>T. rubrum</i>	Pele glabra	F	49
68	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	9
69	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	SD
70	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	36
71	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	44
72	<i>T. interdigitale</i>	Unha	M	68
73	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	47
74	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	16
75	<i>T. rubrum</i>	Pele do tronco	M	36
76	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	66
77	<i>T. rubrum</i>	Unha	SD	SD
78	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	50
79	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	51
80	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	65
81	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	45
82	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	24
83	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	44
84	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	40
85	<i>T. rubrum</i>	Pele glabra	M	69
86	<i>T. rubrum</i>	Pele glabra	M	SD
87	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	53
88	<i>T. rubrum</i>	Pele glabra	F	67
89	<i>T. rubrum</i>	Pele da virilha	F	64
90	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	20
91	<i>T. rubrum</i>	Pele glabra	M	12
92	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	61
93	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	15
94	<i>T. interdigitale</i>	Pele da perna	F	37
95	<i>T. rubrum</i>	Pele glabra	M	16
96	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	66

97	<i>T. rubrum</i>	Pele do tronco	M	43
98	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	17
99	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	24
100	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	64
101	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	35
102	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	11
103	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	24
104	<i>T. rubrum</i>	<u>Pele glabra</u>	F	30
105	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	20
106	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	64
107	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	54
108	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	35
109	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	47
110	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	21
111	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	SD
112	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	10
113	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	35
114	<i>T. rubrum</i>	Pele da virilha	SD	SD
115	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	77
116	<i>T. rubrum</i>	Pele glabra	F	77
117	<i>T. rubrum</i>	SD	F	SD
118	<i>T. rubrum</i>	Pele glabra	M	72
119	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	SD
120	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	53
121	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	SD
122	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	31
123	<i>T. rubrum</i>	Unha	SD	SD
124	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	40
125	<i>T. rubrum</i>	Pele da perna	M	80

126	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	36
127	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	6
128	<i>T. rubrum</i>	Pele glabra	F	SD
129	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	51
130	<i>T. interdigitale</i>	Unha	F	53
131	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	SD
132	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	70
133	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	29
134	<i>T. rubrum</i>	Pele glabra	M	64
135	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	45
136	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	33
137	<i>T. rubrum</i>	Unha	SD	SD
138	<i>T. rubrum</i>	Unha	SD	SD
139	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	12
140	<i>T. rubrum</i>	Unha	SD	SD
141	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	19
142	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	45
143	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	SD
144	<i>T. rubrum</i>	Pele glabra	M	63
145	<i>T. rubrum</i>	Unha	SD	SD
146	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	18
147	<i>T. rubrum</i>	Unha	SD	SD
148	<i>T. interdigitale</i>	Unha	F	73
149	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	15
150	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	SD
151	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	62
152	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	59
153	<i>T. rubrum</i>	Unha	SD	SD

154	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	77
155	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	27
156	<i>T. rubrum</i>	Unha	SD	SD
157	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	42
158	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	51
159	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	16
160	<i>T. rubrum</i>	Unha	M	32
161	<i>T. rubrum</i>	Unha	F	19
162	<i>T. rubrum</i>	SD	SD	SD
163	<i>T. rubrum</i>	SD	SD	SD
164	<i>T. rubrum</i>	SD	SD	SD

SD – Sem dados; F – feminino; M – masculino; T – *Trichophyton*.

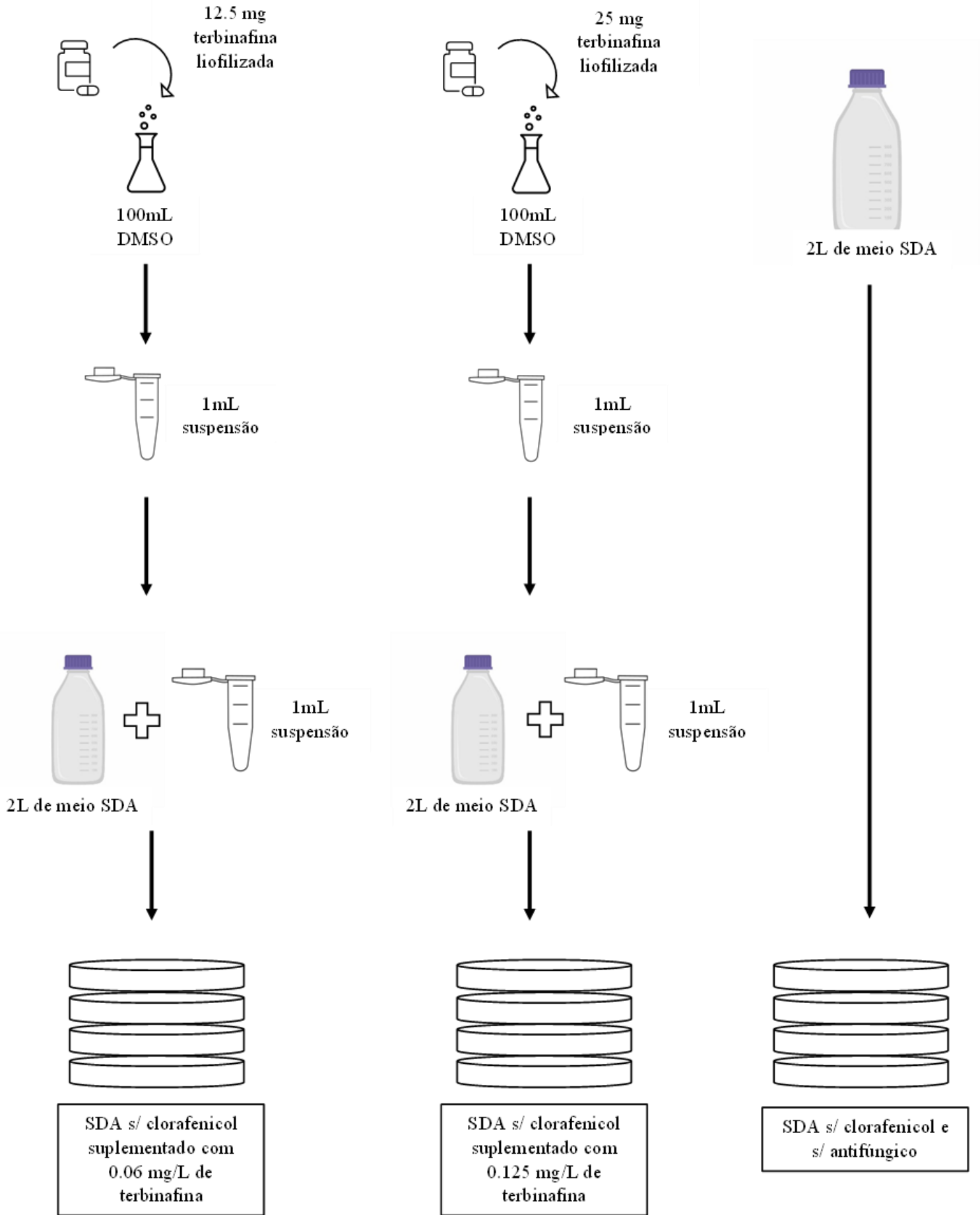


Figura Suplementar 1 - Esquema da metodologia de preparação dos meios com antifúngico.

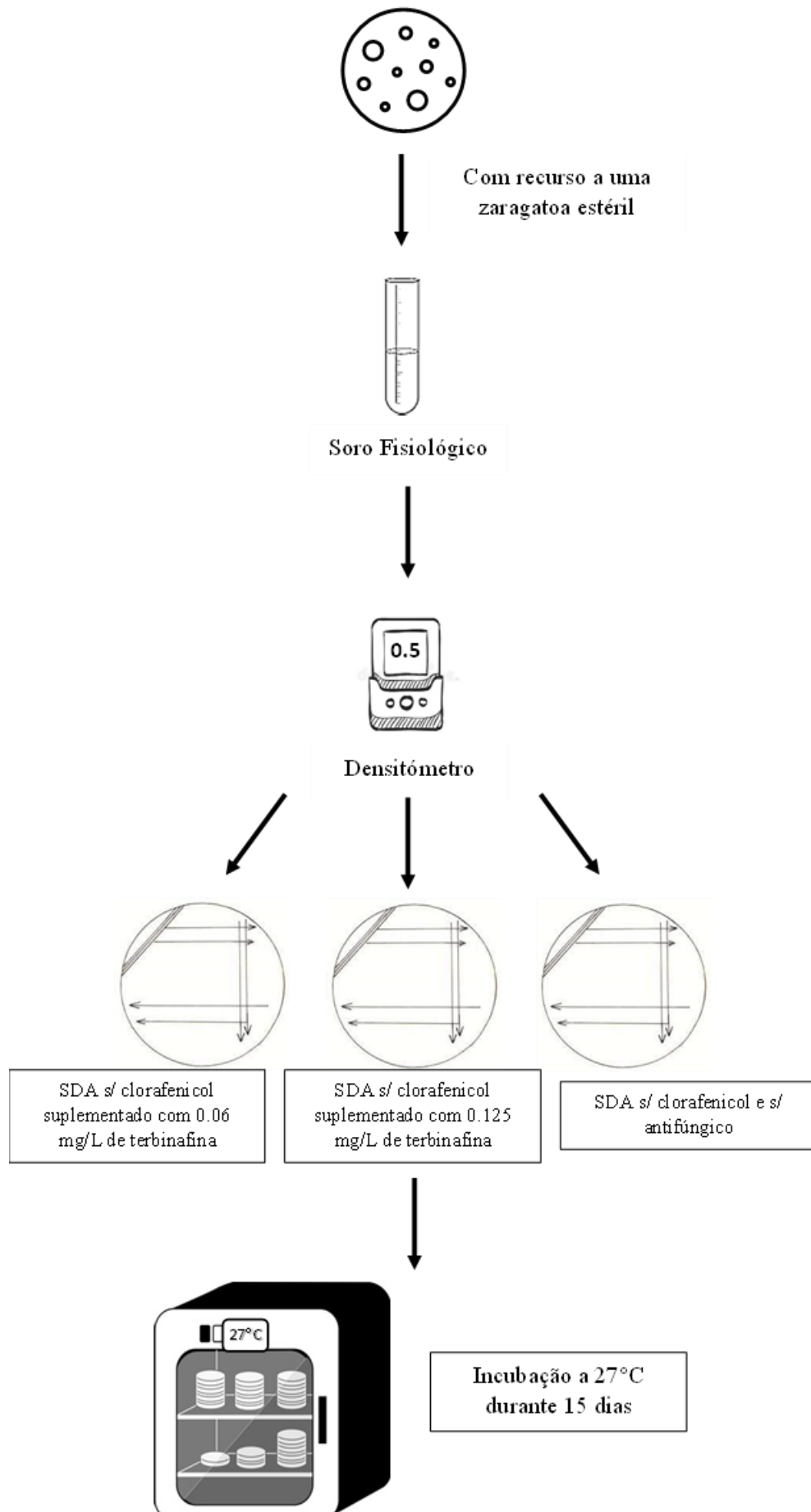


Figura Suplementar 2 - Esquema da metodologia dos meios de screening em agar suplementado com terbinafina em cada um dos isolados estudados.

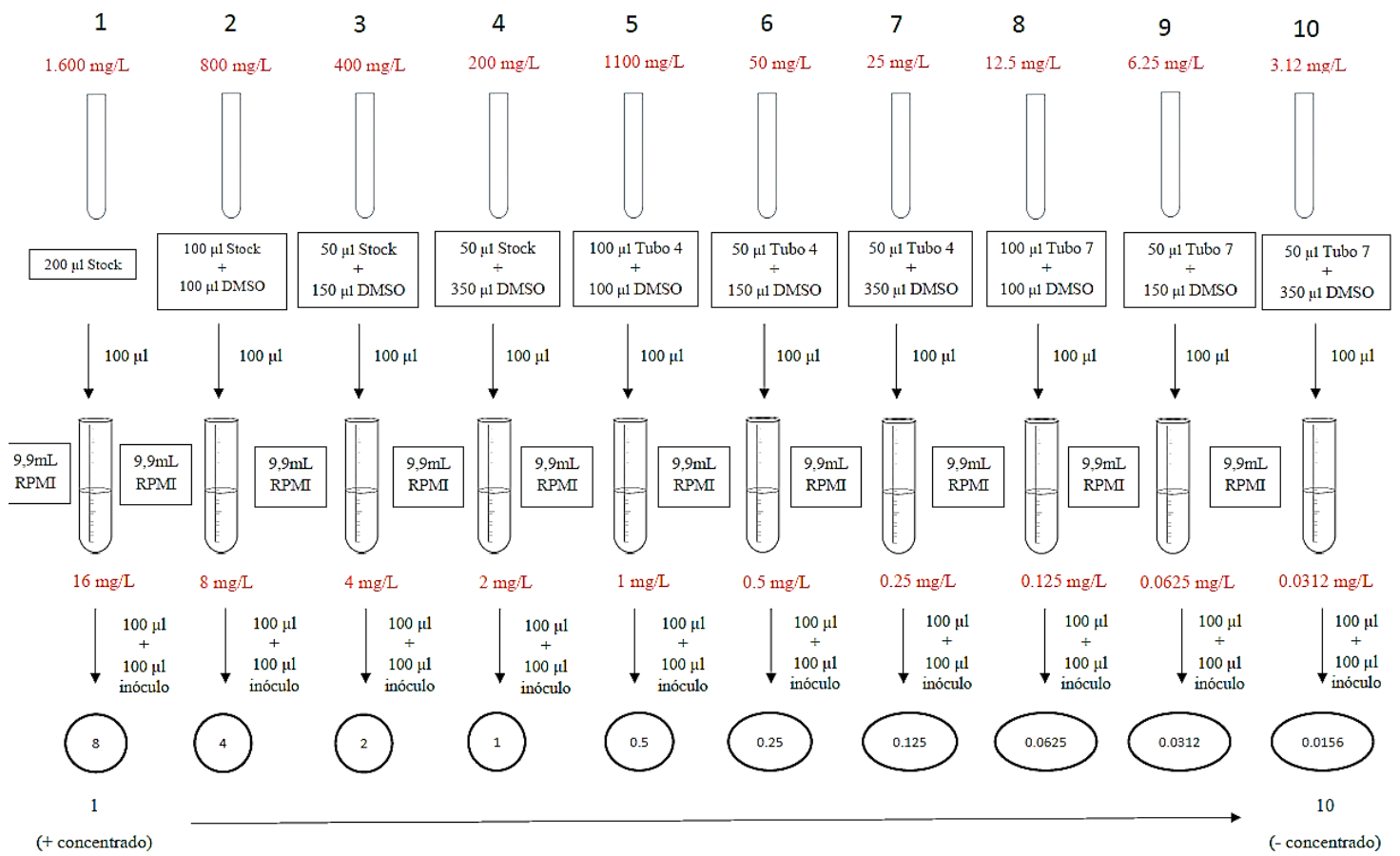


Figura Suplementar 3 - Esquema da metodologia da determinação das CMI's por microdiluição em placa.