



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA
EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA
EM DOENÇAS INFECCIOSAS

MARIANA LUCY MESQUITA RAMOS

**ANÁLISE COMPARATIVA DE FATORES
ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Microsporium canis* DE ORIGEM
HUMANA E ANIMAL**

Rio de Janeiro

2019

MARIANA LUCY MESQUITA RAMOS

**ANÁLISE COMPARATIVA DE FATORES
ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Microsporum canis* DE ORIGEM
HUMANA E ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
Stricto Sensu do Instituto Nacional de Infectologia Evandro
Chagas para obtenção de grau de Mestre em Pesquisa
Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores:

Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes

Profa. Dra. Maria Helena Galdino Figueiredo de Carvalho

Rio de Janeiro

2019

MARIANA LUCY MESQUITA RAMOS

ANÁLISE COMPARATIVA DE FATORES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Microsporium canis* DE ORIGEM HUMANA E ANIMAL

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção de grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores:

Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes

Profa. Dra. Maria Helena Galdino Figueiredo de Carvalho

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr.^a Maria Clara Gutierrez Galhado (Presidente)
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI/ Fiocruz

Prof^a. Dr.^a Livia de Souza Ramos
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Francisco de Assis Baroni
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

Prof. Dr.^a Andréa Reis Bernardes de Souza Engemann (Revisora/ Suplente)
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI/ Fiocruz

Dedico este trabalho

Aos meus amados pais, Waldyr Vaz Ramos Junior e Maria de Fatima Mesquita Ramos,
por toda ajuda que sempre me deram, o amor e a compreensão da vida.

Ao meu querido esposo, Rogerio Duarte Gonçalves,
por todo o carinho, paciência e dedicação em minha vida.

A minha filha Luiza Ramos Giglio Pereira,
minha razão de felicidade e amor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus, pela felicidade em minha vida, pela saúde e a conquista de mais uma etapa.

Ao meu grande orientador Professor Dr. Rodrigo de Almeida Paes, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela amizade, carinho e a ajuda em todos os momentos.

À minha grande Professora Dra. Rosane Orofino Costa, pela parceria neste trabalho e mais uma vez estar presente em uma etapa importante da minha vida contribuindo com seus conhecimentos, amizade e carinho sempre presentes.

À minha querida amiga Priscila Marques de Macedo, pelo seu carinho, amizade e por me ajudar na realização deste trabalho, auxiliando com seus conhecimentos e admirável dedicação profissional.

À minha querida coorientadora Maria Helena Galdino Figueiredo de Carvalho, pela paciência e orientação no laboratório durante a realização deste trabalho, e acima de tudo sua amizade.

À professora Dr^a Maria Clara Gutierrez Galhardo, por me acompanhar em todos os seminários, sempre com valiosas contribuições, e por participar em minha banca auxiliando no meu crescimento profissional.

Aos professores Dr. Francisco de Assis Baroni e Dr^a. Livia Souza Ramos, por gentilmente se dedicarem na avaliação deste trabalho e pela presença em minha banca contribuindo com seus estimáveis conhecimentos.

À minha admirável amiga Andréa Reis Bernardes de Souza Engemann, pela sua amizade, por estar presente em mais uma etapa na minha jornada da micologia, contribuindo com seus ensinamentos, correções e dicas, que faz com tanto carinho e dedicação.

Aos amigos Rowena Alves Coelho e Fábio Brito dos Santos, pela auxílio e carinho no laboratório, a amizade, ensinamentos e momentos agradáveis.

As minhas colegas e amigas de mestrado Alessandra Leal Silva Chaves, Iara Bastos de Andrade, Ingrid Ludmilla Rodrigues da Cruz, pela parceria no conhecimento e no compartilhar do nosso dia a dia de experimentos.

Aos alunos Jonas Pereira Campos e Marcos Vinícius Santos pelos auxílios nos experimentos e momentos descontraídos.

À Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira, pela atenção e gentil contribuição na obtenção de amostras de material clínico para a realização deste trabalho.

Aos colegas dos Laboratórios de Micologia Ambiental e de Imunodiagnóstico, pela disponibilidade de colaboração e suporte no desenvolvimento deste trabalho.

À querida Carla Pena sempre prestativa e atenciosa nos momentos precisos.

Aos colegas do Setor de atendimento de Dermatozoonose INI/ Fiocruz, pelo fornecimento de amostras.

Aos amigos do Laboratório de Micologia-HUPE/UERJ, Dávson Aguilar Guimarães, Mário Gioia Premazzi, Ione Carlos da Silva, Kátia Rodrigues de Lemos, Marcos Antônio Formiga e Raphael da Silva Roma, por toda a dedicação, disponibilidade, fornecimento de amostras e todo o carinho que sempre me receberam.

Aos tão queridos amigos Sidney Jiro Nohara, Carlos Gabriel Dias, Alexandra Ferreira Caridade, Elaine de Albuquerque e Azevedo, Priscila das Mercês de Sena, Andreia Rocha Diniz e Lucia Helena Pinto Lopes, pela amizade, preocupação e carinho em ajudar no fornecimento de amostras para a contribuição do trabalho.

À coordenação da Pós-Graduação do INI, a todos os professores e colegas de turma pela ajuda, contribuições e palavras de incentivo.

À Priscilla Tavares de Sá pela atenção e auxílio nos momentos burocráticos do curso de pós-graduação.

Aos meus tão amados, pais, esposo, filha, irmãos, enteadas, toda à família e amigos, que sempre me apoiaram e me acompanharam nas boas e difíceis fases da vida.

“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor.... Lembre-se. Se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele conquistará o mundo”.

Albert Einstein

RAMOS, Mariana Lucy Mesquita. **Análise comparativa de fatores associados à virulência de isolados clínicos de *Microsporium canis* de origem humana e animal.** 2019. 77 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2019.

RESUMO

Microsporium canis é um dermatófito zoofílico, sendo o fungo mais frequentemente isolado de cães e gatos. A transmissão de *M. canis* é feita diretamente por animais contaminados ou por fômites contaminadas por eles. Podem também ser encontrado no solo na forma saprotrófica, utilizando a queratina presente neste habitat. Durante o processo de invasão, esses patógenos utilizam diferentes enzimas, apontadas como fatores associados à virulência, que contribuem para a patogenicidade deste agente, sendo a queratinase uma das mais importantes. Uma vez que o número de animais de estimação vem aumentando progressivamente nos domicílios brasileiros, é necessário ampliar o conhecimento sobre as doenças decorrentes da interação entre humanos e animais domésticos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi comparar a expressão de enzimas associadas à virulência e a termotolerância de cepas de *M. canis* isoladas de animais (cães e gatos) e humanos. Foram incluídos neste estudo 12 cães sintomáticos, 15 gatos sintomáticos, 11 gatos assintomáticos e 14 pacientes humanos, todos com isolamento de *M. canis* em cultivo de material de lesões ou dos pelos saudáveis, no caso dos gatos assintomáticos. Foram analisadas as produções das enzimas catalase, urease, queratinase, hemolisina e aspártico-protease de todas as cepas de *M. canis* obtidas no estudo através de métodos *in vitro* descritos na literatura. Além disso, a termotolerância foi avaliada através de análise comparativa do crescimento das cepas a 25°C e a 35°C. Os resultados obtidos nos diferentes grupos foram comparados através de testes não paramétricos. Em relação à produção de queratinase e hemolisina, a maior parte dos isolados apresentou baixa atividade enzimática, sendo alguns classificados como moderados e nenhum dos isolados apresentou alta atividade enzimática. Em relação à produção de aspártico-protease, a maior parte dos isolados analisados se mostrou como moderados produtores desta enzima, sendo poucos classificados como fracos ou fortes produtores. Em relação à produção da enzima urease, os isolados apresentaram atividade enzimática variando de negativa, fraca, média a forte entre os quatro grupos estudados. Todos os isolados apresentaram atividade enzimática para catalase, porém todos foram classificados como baixos produtores desta enzima. Quanto à termotolerância, todos os isolados apresentaram crescimento em cultura nas duas temperaturas estudadas (25°C e 35°C) e puderam ser classificados como possuindo baixa, média ou alta termotolerância, sendo a maioria dos isolados classificados nas duas últimas categorias. A expressão global dos fatores estudados variou entre os isolados e os diferentes grupos de hospedeiros. De modo geral, o fator associado à virulência mais expressivo foi a termotolerância, seguido da produção de aspártico-proteases. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa dos fatores associados à virulência estudados entre os quatro grupos de hospedeiros ($p>0,05$) nem entre cepas isoladas de gatos sintomáticos e assintomáticos. Concluímos que os fatores associados à virulência estudados não estão associados à instalação do *M. canis* de animais para humanos, nem na sintomatologia apresentada por gatos infectados por este fungo dermatófito.

Palavras-chave: Dermatofitose. *Microsporium canis*. Virulência.

RAMOS, Mariana Lucy Mesquita. **Comparative analysis of virulence factors of *Microsporium canis* clinical isolates from human and animal origin.** 2019. 77 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2019.

ABSTRACT

Microsporium canis is a zoophilic dermatophyte, being the most common fungus isolated in dogs and cats. The transmission of *M. canis* is done directly by contaminated animals or fomites contaminated by them, and it can be found also in soil in the saprotrophic form, using the keratin present in this habitat. During the invasion process, these pathogens use different enzymes, indicated as factors associated with virulence, that contribute to the pathogenicity of this agent, being keratinase one of the most important. Since the number of animals has been increasing in Brazilian houses, it is necessary to enlarge the knowledge about the diseases coming from the interaction between humans and domestic animals. Thus, the aim of this study is to compare the expression of enzymes associated with virulence and thermotolerance of *M. canis* strains isolated from animals (dogs and cats) and humans. It included 12 symptomatic dogs, 15 symptomatic cats, 11 asymptomatic cats and 14 human patients, all with *M. canis* isolation in culture of skin lesions or healthy fur, in case of asymptomatic cats. The production of the enzymes catalase, urease, keratinase, hemolysin and aspartic protease by all strains of *M. canis* was analyzed by *in vitro* methods described in the literature. In addition, thermotolerance was assessed by comparative analysis of the growth of the strains at 25 ° C and at 35 ° C. The results obtained in the different groups were compared through non-parametric tests. Regarding the production of keratinase and hemolysin, most of the isolates showed low enzymatic activity, some of them were classified as moderate and none of the isolates presented high enzymatic activity. In relation to the production of aspartic protease, most of the isolates analyzed were moderate producers of this enzyme, being few classified as weak or strong producers. Regarding the production of the urease enzyme, the isolates presented enzymatic activity ranging from negative, weak, medium to strong among the four groups studied. All the isolates presented enzymatic activity for catalase, but all were classified as low producers of this enzyme. Regarding thermotolerance, all the isolates presented growth in the culture of the two temperatures studied (25°C and 35°C) and could be classified as having low, medium or high thermotolerance, with the majority of isolates classified in the last two categories. The global expression of the factors studied varied between the isolates and the different groups of hosts. In general, the virulence factor most expressive was thermotolerance, followed by the production of aspartic proteases. There was no statistically significant difference in virulence-associated factors among the four groups of hosts ($p>0.05$) or between strains isolated from symptomatic and asymptomatic cats. We conclude that the virulence factors studied are not associated to the installation of *M. canis* from animals to humans, nor in the symptoms presented by cats infected with this dermatophyte fungus.

Keywords: Dermatophytosis. *Microsporium canis*. Virulence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Felinos sintomáticos infectados por <i>Microsporium canis</i> .	17
Figura 2. Felino assintomático, sem alterações clínicas, com cultura positiva para <i>Microsporium canis</i> .	18
Figura 3. Lesões de <i>Microsporium canis</i> em canino.	20
Figura 4. Canino sintomático com lesões causadas pelo <i>Microsporium canis</i> .	20
Figura 5. Formas clínicas de dermatofitose humana.	23
Figura 6. Parasitismo no pelo e na pele de animal por <i>Microsporium canis</i> .	26
Figura 7. Aspecto macroscópico e microscópico do <i>Microsporium canis</i> .	27
Figura 8. Meios de cultura em placa com demonstração da produção enzimática (Produção de halo)	45
Figura 9. Teste de urease de alguns isolados de <i>Microsporium canis</i>	49
Figura 10. Culturas dos isolados de <i>M. canis</i> inoculadas em meio PDA sem inclinação após adição de peróxido de hidrogênio 30% e tween 20.	51
Figura 11. Cultura fúngica da colônia de <i>Microsporium canis</i> em meio Ágar Sabourard com clorafenicol.	53
Figura 12. Comparação de fatores associados à virulência de isolados de <i>Microsporium canis</i> neste estudo.	55

LISTA DE TABELAS

- | | |
|---|----|
| Tabela 1. Variação dos valores de Pz relacionados às atividades enzimáticas de queratinase, hemolisina e aspártico-protease nos isolados clínicos de <i>M. canis</i> em diferentes hospedeiros. | 45 |
| Tabela 2. Média e desvio padrão dos valores de Pz relacionados às atividades enzimáticas de queratinase, hemolisina e aspártico-protease nos isolados clínico de <i>M. canis</i> em diferentes hospedeiros. | 45 |
| Tabela 3. Variação dos valores de absorbância relacionados as atividades enzimáticas da urease nos isolados clínicos de <i>M. canis</i> em diferentes hospedeiros. | 49 |
| Tabela 4. Variação dos valores da altura de bolhas relacionada à atividade enzimática da catalase nos isolados clínicos de <i>Microsporium canis</i> em diferentes hospedeiros. | 51 |
| Tabela 5. Variação dos valores do percentual de inibição do crescimento relacionados à termotolerância nos isolados clínicos de <i>M. canis</i> em diferentes hospedeiros. | 53 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CA	Agar Columbia (do inglês “Columbia Agar”)
DO	Densidade Ótica
DPP	Dipeptidil Peptidase
FELV	Vírus da Leucemia Felina (do inglês “Feline Leukemy Virus”)
FIV	Vírus da Imunidade Felina (do inglês “Feline Immunodeficiency Virus”)
GMS	Metanamina de Prata Grocott- Gomori (do inglês Gomori Metanamine Silver)
ITS	Espaçador Interno Transcrito (do inglês “Internal Transcriber Spacer”)
NTS	Regiões de Espaçadores Não Transcritos (do inglês No Transcriber Spacer”)
PAS	Ácido Peródico de Schiff
PDA	Potato Dextrose Ágar
RAPD	Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (do inglês “Random Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism”).
rDNA	Genes de RNA Ribossômico.
SAPS	Aspártico-Protease secretadas (do inglês “Secreted Aspartic Peptidases”).
SDA	Sabouraud Dextrose Ágar.
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 FUNGOS DERMATÓFITOS.....	15
1.2 DERMATOFITOSE.....	15
1.3 <i>Microsporum canis</i>	16
1.3.1 Manifestações clínicas em animais	16
1.3.2 Manifestações clínicas em humanos.....	21
1.3.3 Fisiopatogenia da dermatofitose.....	24
1.3.4 Epidemiologia da dermatofitose por <i>Microsporum canis</i>	25
1.3.5 Diagnóstico Laboratorial do <i>Microsporum canis</i>	26
1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA DOS DERMATÓFITOS	28
1.4.1 Proteases.....	28
1.4.2 Queratinase	29
1.4.3 Elastase.....	30
1.4.4 Catalase	31
1.4.5 Urease	31
1.4.6 Hemolisina.....	31
1.4.7 Lipases	32
1.4.8 - Dnase	33
1.4.9 - Termotolerância.....	33
2. JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. OBJETIVO GERAL	36
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4. MATERIAIS, PACIENTES E MÉTODOS.....	37
4.1. APROVAÇÃO ÉTICA.....	37
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO.....	37
4.2.1 Pacientes humanos	37
4.2.2 Animais sintomáticos	38

4.2.3 Animais assintomáticos	38
4.3. COLETA DE MATERIAL CLÍNICO	38
4.3.1 Pacientes humanos	38
4.3.2 Pacientes animais sintomáticos	39
4.3.3 Pacientes animais assintomáticos	39
4.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO	39
4.5 PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS	39
4.5.1 Atividade de queratinase	40
4.5.2 Atividade hemolítica	40
4.5.3 Atividade de aspártico-proteases	41
4.5.4 Produção de catalase	41
4.5.5 Produção de urease	41
4.6 TESTE DE TERMOTOLERÂNCIA	42
4.7 ANÁLISE DE RESULTADOS	42
5. RESULTADOS	44
5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO <i>Microsporium canis</i>	44
5.1.1 Em animais	44
5.1.2 Em humanos	44
5.2 PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS	45
5.3 TESTE DE TERMOTOLERÂNCIA	52
5.4 ANÁLISE GLOBAL DA VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS	54
6. DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÕES	64
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
9 ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 FUNGOS DERMATÓFITOS

Os dermatófitos compõem um grupo de fungos filamentosos patogênicos queratinofílicos, e por isso podem ser encontrados parasitando pele, pelo e unha de humanos e animais. Algumas espécies vivem de maneira saprotrófica no solo, nutrindo-se da queratina presente neste habitat (CRUZ, 2010). Historicamente, três gêneros anamórficos de fungos dermatófitos eram denominados: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, cujos teleomorfos conhecidos distribuíam-se nos gêneros *Arthroderma* e *Nannizzia* (LACAZ, 2002). Entretanto, com o advento da taxonomia polifásica, utilizando metodologias de filogenia e biologia molecular, nove gêneros holomórficos são hoje descritos: *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Paraphyton*, *Lophophyton*, *Microsporum*, *Arthroderma*, *Ctenomyces* e *Guarromyces*, tendo as setes primeiros espécies capazes de causar infecção em humanos e/ou outros animais (HOOG et al, 2017).

Ecologicamente, os dermatófitos podem ser classificados como zoofílicos, espécies com transmissão de animais para o homem, como o *Microsporum canis*; antropofílicos quando são restritos a humanos e raramente causam doenças em animais, por exemplo, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton interdigitale*; e geofílicos, quando fungos presentes no solo podem ocasionalmente ser encontrados parasitando o homem ou animais como *Nannizzia gypsea*, anteriormente denominado *Microsporum gypseum* (CRUZ, 2010).

1.2 DERMATOFITOSE

As infecções causadas por fungos dermatófitos, denominadas dermatofitoses, são responsáveis por 20% a 25% das infecções de pele causadas em humanos e animais (FAWAY; ROUVROIT; POUMAY, 2018). As dermatofitoses são de grande importância para a saúde pública, pois podem ser uma zoonose transmitidas por animais do convívio dos humanos ou causar pequenos surtos (ZHAN; LIU, 2016). A prevalência das dermatofitoses

varia de acordo com o clima, temperatura, umidade relativa e precipitação de chuva em diferentes regiões geográficas ou reservatórios naturais (IORIO et al., 2007).

Os sinais clínicos de dermatofitose se mostram resultantes da quebra dos tecidos queratinizados devido à ação fúngica, bem como da resposta imune do hospedeiro infectado. Espécies zoofílicas tais como *M. canis*, normalmente menos adaptadas aos humanos, podem apresentar neste hospedeiro resposta inflamatória mais grave do que as espécies antropofílicas (FAWAY; ROUVROIT; POUMAY, 2018). As dermatopatias causadas por *M. canis* também não costumam causar infecções crônicas em humanos (HOOG et al., 2017).

Na dermatofitose, o *Microsporum canis* é a espécie mais comumente isolada na rotina dermatológica da clínica de pequenos animais (GNAT et al., 2018a). Em humanos, é o principal agente da tinea corporis e tinea capitis nos países do Mediterrâneo. Além disso, a prevalência da tinea capitis em crianças está aumentando globalmente nas grandes cidades da Europa e América, causando epidemias, tornando-se uma preocupação para os órgãos de Saúde Pública (HAYETTE; SACHELI, 2015).

1.3 *Microsporum canis*

Microsporum canis é o fungo dermatófito de caráter antrozoofílico mais isolado em cães e gatos, possuindo grande importância em Saúde Pública (BALDA et al., 2004). Durante a invasão do hospedeiro, as hifas se fragmentam em estruturas denominadas arthroconídios, que garantem a infectividade do fungo (GNAT et al., 2018b). Na avaliação clínica, observa-se fluorescência azul esverdeada pela lâmpada de Wood na presença de *M. canis*, as quais se apresentam como agentes de parasitismo ectotrix no pelo dos animais e homens infectados (FARIAS et al., 2011). Em cultivo ou no meio ambiente, apresentam conídios de dois tipos: microconídios, piriformes e em pequenos números e macroconídios fusiformes equinulados e abundantes (CRUZ, 2010).

1.3.1 Manifestações clínicas em animais

Nos animais, *M. canis* apresenta maior ocorrência em filhotes quando comparado aos adultos. A frequência encontrada costuma mostrar-se maior em felinos do que em cães,

principalmente pelo fato dos felinos apresentarem um número maior de quadros assintomáticos (VIANI et al., 2001). Gatos assintomáticos podem apresentar um índice de positividade para *M. canis* variando de oito até 88% dos animais em centros de adoção (FARIAS et al., 2011).

Nos cães, há uma predisposição da raça Yorkshire e em felinos, a raça Persa apresenta uma maior susceptibilidade à infecção por esse fungo (BALDA et al., 2004).

A transmissão de *M. canis* é feita diretamente por animais contaminados ou por fômites contaminados por eles, podendo o fungo também ser encontrado mais raramente no solo na forma saprobiótica, já que utiliza a queratina presente neste habitat (YU et al., 2004, FARIAS et al., 2011).

Nos animais, as lesões variam de acordo com o estado imunológico deste ou com o grau de patogenicidade da cepa fúngica e ainda da carga do inóculo. O comprometimento cutâneo pode variar de localizado, multifocal a generalizado. As lesões podem ser discretas e as alterações observadas podem variar de queda de pelo (**Figura 1**), acompanhada de descamação, ou apresentar uma resposta inflamatória mais intensa, com bordas ligeiramente mais elevadas e áreas hiperemiadas. O prurido, quando presente, é geralmente mínimo e leve.

Figura 1. Felinos sintomáticos infectados por *Microsporium canis*



Legenda: a) felino com alopecias e crostas ao longo do corpo. b) felino com emagrecimento e acentuada alopecia por todo o corpo.

Fonte: imagens gentilmente cedidas pelo médico veterinário Sidney Nohara.

De acordo com um estudo feito por Balda e colaboradores (2004), a alopecia é o sintoma clínico mais observado nas lesões causadas por dermatofitose, podendo mimetizar inúmeras outras dermatoses e ocasionalmente os gatos podem apresentar otite por *M. canis*. No trabalho de Ramos e colaboradores (2014) em isolamento e identificação de dermatites causadas por fungos causadores de micoses cutâneas, foram avaliados 34 cães positivos para

fungos em pele e concomitante observou-se como sinais clínicos: prurido (73%), eritema (44,1%), crostas melicéricas (29,4%), caspa (23,5%), hiperkeratose (20,6%) e alopecia (20,2%).

1.3.1.1 Manifestações clínicas em felinos

Os felinos, especialmente os gatos, podem ser considerados como hospedeiros naturais e reservatórios de *M. canis*, pois este fungo pode ser isolado dos pelos de animais clinicamente saudáveis (**Figura 2**) (MIGNON et al., 1999). No exame histopatológico, gatos sintomáticos apresentam quadros agudos ou perifoliculites subagudas e foliculites, enquanto os gatos assintomáticos apresentam uma inflamação crônica caracterizada pelo infiltrado dos mastócitos na camada superficial da derme (VIANI et al., 2001). Raramente, apresentam dermatite miliar ou nódulos dérmicos (CRUZ, 2010).

Figura 2. Felino assintomático, sem alterações clínicas, com cultura positiva para *Microsporium canis* de pelo coletado.



Fonte: Sidney Nohara.

No trabalho de Moriello e colaboradores (2017), foi demonstrado que doenças imunossupressoras muito comuns em gatos como as infecções pelos vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV), não estão relacionadas à predisposição de dermatofitose. Um estudo avaliou a microbiota fúngica de gatos imunossuprimidos para determinar se este era um fator de risco. Neste estudo a microbiota fúngica de gatos soropositivos para FIV, FeLV ou ambos foi comparada à microbiota fúngica cutânea de gatos soronegativos com várias doenças sistêmicas. O estudo constatou que os

gatos soropositivos para FIV e FeLV carregavam uma maior diversidade de fungos saprotróficos e leveduras do gênero *Malassezia*, mas o carreamento de dermatófitos era raro e não havia diferença entre gatos soropositivos e soronegativos com doenças sistêmicas .

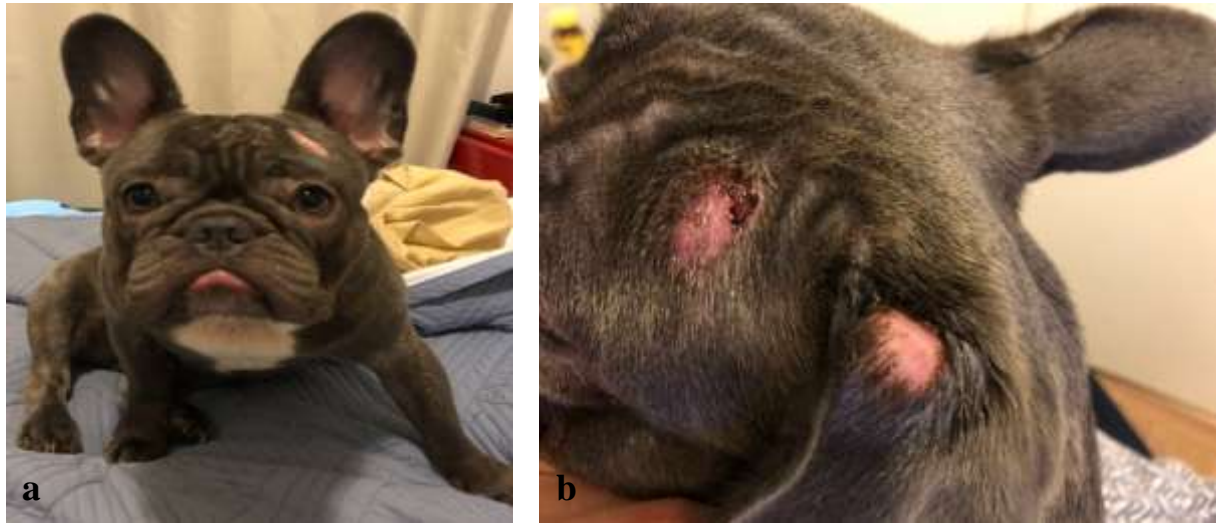
Quadros de pseudomicetomas causados por *M. canis* já foram relatados em gatos e a raça Persa parece ter uma predileção por esta manifestação. Apresenta uma casuística rara, e podem acometer principalmente região subcutânea, com presença de piogranulomas ou granulomas inflamatórios. Na maioria dos casos está associado aos gatos que estão com dermatofitose e podem ser encontrados na região dorsal do tórax, pescoço, cauda, região ventral do tórax ou abdominal, região intra-abdominal e região de linfonodos (BIANCHI et al., 2017).

Bianchi e colaboradores (2017) relataram dois casos de pseudomicetoma. No primeiro, um gato da raça Persa com dermatofitose por *M. canis* após ter sido tratado para tal fungo, teve que ser submetido a uma cirurgia de nefrectomia devido à presença de cálculos. Três meses após a cirurgia apresentou uma massa pseudotumoral na região cranial à bexiga e um fecaloma na região do intestino. Já no segundo caso, outro felino da mesma raça, sem sinais clínicos de dermatofitose, apresentou massa intra-abdominal, impactação fecal, disquesia e tenesmo quatro meses após castração. Nos dois casos, as massas foram retiradas e após análise histopatológica foi observada a presença de estruturas fúngicas com cultivo positivo para *M. canis*. Suspeita-se de possível contaminação do fungo presente na pelagem desses animais, em alguns casos de forma assintomática, durante os procedimentos cirúrgicos.

1.3.1.2 Manifestações clínicas em cães

Nos cães, pode-se observar foliculite facial, eritema (**Figura 3**) e furunculose, quériões nos membros ou na face, hiperqueratose ou hiperkeratose (**Figura 4**), além de nódulos dérmicos no tronco (CRUZ, 2010; HNILICA, 2012). E em alguns casos, pode ocorrer infecção secundária.

Figura 3. Lesões causadas por *Microsporium canis* em canino da raça Buldogue Francês



Legenda: a) foliculite em face. b) lesão eritomatosa com presença de infecção secundária.
Fonte: Próprio autor

Figura 4. Canino sintomático com lesões causadas pelo *Microsporium canis*



Legenda: a) visão geral do animal. b) alopecia na região torácica e hiperqueratose na região ventral
Fonte: Próprio autor

Em relação às doenças imunossupressoras e à presença de dermatofitoses nos cães, Moriello e colaboradores (2017) demonstraram que cinco artigos descrevem cães (10 cães no total) com doenças concomitantes e dermatofitose. Quatro trabalhos descrevem dermatofitose e hiperadrenocorticismismo concomitantes em cães (ZUR, WHITE, 2011; HALL, MILLER, MEDLEU, 1984; CHEN, SU, 2002; MACKAY, JOHNSTONE, OBOYLE, 1997). Outro trabalho descreve seis cães Yorkshire terrier com dermatofitose e leishmaniose concomitante,

leishmaniose e erliquiose e diabetes mellitus (CERUNDOLO, 2004). Embora haja apenas um artigo documentando dermatofitose e demodicose concomitantes, na opinião dos autores, é considerado provável que a infecção dupla seja mais comum do que até hoje foi relatado (ANGARANO, SCOTT, 1987).

1.3.2 Manifestações clínicas em humanos

A dermatofitose em humanos é considerada uma das infecções fúngicas mais comuns. As espécies zoofílicas são responsáveis por cerca de 30% das dermatofitoses humanas e geralmente provocam uma inflamação aguda, enquanto as espécies antropofílicas representam cerca de 70% das infecções nesses hospedeiros, causando uma infecção crônica e de progressão lenta, sugerindo que o fungo tenha se adaptado ao hospedeiro humano (PERES et al, 2010).

Os sintomas da dermatofitose podem ser leves ou mais graves dependendo do estado imunológico do hospedeiro, e geralmente não ocorre invasão de tecidos subcutâneos ou órgãos internos. As lesões características nas infecções de pele são circulares, eritematosas e pruriginosas, sendo consequentes da ação direta do fungo ou de reações de hipersensibilidade ao microrganismo e/ou a seus produtos metabólicos (LACAZ, 2002; ZAITZ, 2010). Nas onicomicoses pode ocorrer descolamento das bordas, espessamento, aparecimento de manchas brancas e até distrofia total das unhas. Embora as infecções causadas por dermatófitos sejam geralmente restritas às regiões superficiais da epiderme (ELAVARASHI et al., 2017), em pacientes imunodeprimidos, a dermatofitose pode, em raros casos descritos na literatura, envolver tecidos subcutâneos e até mesmo órgãos profundos, possivelmente se tornando uma doença fatal na ausência de tratamento adequado (WU et al., 2013).

Embora geralmente não seja uma condição grave, seus impactos na qualidade de vida são significativos. Além da dor local e sensações desagradáveis ao redor das lesões, os pacientes sofrem psicologicamente devido às características estéticas das lesões e suas consequências sociais (FAWAY; ROUVROIT; POUMAY, 2018).

Nos quadros em humanos a dermatofitose pode ser classificada de acordo com os sítios anatômicos afetados como: tinea corporis (corpo), tinea barbae (barba), tinea capitis (couro cabeludo), tinea faciei (face), tinea pedis (pés), tinea manuum (mãos), tinea cruris (virilha), tinea unguium (unhas).

A tinea faciei é limitada à pele glabra da face. Comum em pacientes pediátricos (**Figura 5c**) e femininos. A infecção pode aparecer em qualquer superfície da face, incluindo o lábio superior e o queixo. Nos homens, a condição é conhecida como tinea barbae quando ocorre uma infecção dermatofítica de áreas com barba com forma sicosiforme lembrando foliculite bacteriana; ou inflamatória, lembrando querion.

Na tinea cruris, as lesões são avermelhadas, descamativas, pruriginosas e afetam parte ou toda a área do púbis, expandindo-se para região abdominal inferior e também para as nádegas, em casos extensos (ZAITZ, 2010).

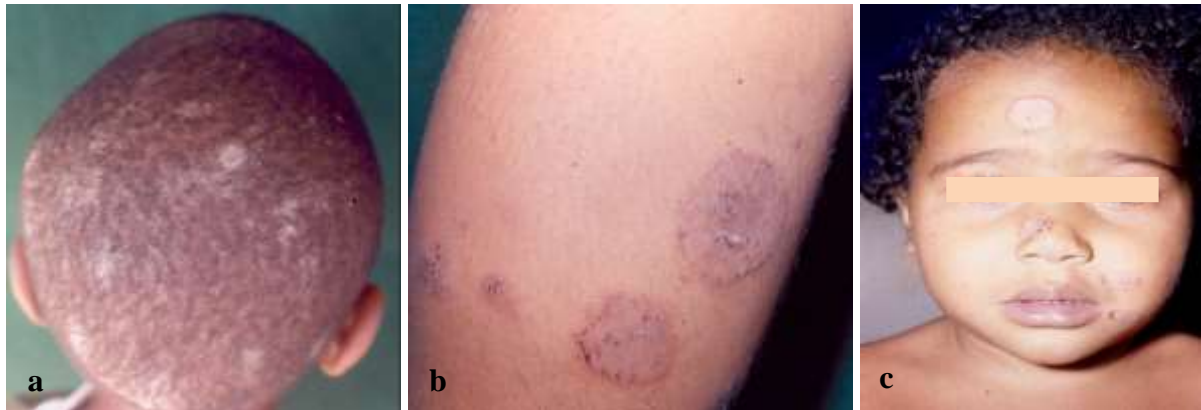
Tinha unguium ou onicomicose por dermatófitos acomete unhas dos pés e das mãos. A apresentação clínica mais comum é a subungueal distal e/ou lateral, seguida da subungueal proximal e superficial branca. As três formas podem evoluir para distrofia parcial ou total da unha (ZAITZ, 2010).

As tinas pedis e manuum são geralmente causadas por dermatófitos do gênero *Trichophyton*, principalmente *T. rubrum*. Nos pés as lesões podem aparecer de forma aguda representada por vesículas bastante pruriginosas na região plantar ou de forma crônica como descamação fina sem muita sintomatologia. Pode afetar as dobras interdigitais (intertrigo) e estar associada à onicomicose, o que é frequentemente observado.

A tinea capitis é mais comumente observada em pessoas de regiões carentes e com hábitos precários de higiene. Pode se apresentar sob a forma de placa de alopecia ou em uma área na qual os pelos foram quebrados ou tonsurados pelo fungo que perfuram a haste dos fios. Afeta principalmente crianças, podendo ser causada por fungos antropofílicos e zoofílicos. Classificada em tonsurante, alopeciante e inflamatória. A forma tonsurante é dividida em microspórica e tricofítica, que podem ser diferenciadas pela manifestação clínica, pelo tipo de parasitismo e agente etiológico. A tinea tonsurante microspórica apresenta lesão extensa e geralmente única, com parasitismo ectothrix, causada por dermatófitos zoofílicos ou geofílicos como *M. canis* e *Nannizzia gypsea*, respectivamente. Na tinea tonsurante tricofítica observam-se múltiplas pequenas lesões, provocando parasitismo endothrix causada por dermatófitos antropofílicos, como o *Trichophyton tonsurans* e *T. rubrum*.

Em humanos, *M. canis* é agente comum de tinea capitis, tinea corporis e tinea faciei (**Figura 5**) podendo causar também, com menor frequência, tinea unguium e tinea barbae. É o agente de tinea capitis mais frequentemente isolado em crianças na fase pré-escolar, devido ao contato estreito destas com os animais, considerados fontes de infecção.

Figura 5. Formas clínicas da Dermatofitose humana.



Legenda: a) tinea capitis. b) tinea corporis. c) tinea faciei
Fonte: Laboratório de Micologia-HUPE/UERJ

Nos quadros de dermatofitose em humanos podem ocorrer ainda as chamadas dermatofítides, que resultam de disseminação hematogênica de produtos tóxicos de natureza fúngica em pele anteriormente sensibilizada. Os critérios de definição das dermatofítides incluem a presença de um foco primário de dermatofitose, a partir do qual há isolamento do fungo e ausência do mesmo nas lesões secundárias (dermatofítides), positividade no teste de intradermorreação utilizando tricofitina demonstrando o estado de hipersensibilidade do hospedeiro e regressão das lesões de hipersensibilidade com o tratamento da lesão primária. Pode-se classificar as dermatofítides como epidérmicas, cutâneas, subcutâneas, vasculares e tipos liquenóides, exantemático e exsudativo e suas formas de apresentação clínica variam, de acordo com o tipo de reação presente (LACAZ, et al., 2002).

Em relação a lesões mais profundas, Lacaz e colaboradores (2002) relatam quadros semelhantes a micetomas causados por fungos dermatófitos (*Microsporum audouinii*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum* e *Trichophyton violaceum*). Grãos parasitários são observados nas lesões, onde ocorre uma reação eosinofílica periférica, devido ação antígeno-anticorpo, característica do fenômeno de Splendore-Hoeppli. O micélio é sempre menos abundante e nunca com entrelaçamento compacto, como nos grãos eumicóticos. Assim denominaram esses casos de pseudomicetoma. Atualmente, *M. canis* também é conhecido como agente de pseudomicetoma (WANG; WANG; LI, 2018) e de acordo com Faway, Rouvroit e Poumay (2018) os dermatófitos podem invadir o tecido dérmico após trauma local em pacientes com infecção crônica. Em pacientes imunodeprimidos, a dermatofitose pode envolver tecidos subcutâneos e até mesmo órgãos profundos, possivelmente se tornando uma doença fatal na ausência de tratamento adequado (WU et al., 2013).

1.3.3 Fisiopatogenia da dermatofitose

Na dermatofitose ocorre a interação entre os arthroconídios dos dermatófitos e o estrato córneo da pele após três a quatro horas de contato entre ambos (PERES; MARANHÃO; MARTINEZ-ROSSI, 2010). Posteriormente, o processo de germinação se inicia seguido de invasão após secreção de enzimas hidrolíticas, principalmente queratinase, e formação de tubos germinativos que crescem formando hifas hialinas e segmentadas detectadas na superfície epidérmica a partir da sexta hora de infecção, atingindo a camada granulosa no quarto dia. Nesta fase, a integridade da barreira epidérmica é perdida em resposta à alteração de zônulas de oclusão. Simultaneamente, os queratinócitos exibem expressão aumentada e liberação de citocinas pró-inflamatórias e peptídeos antimicrobianos, que serão responsáveis pelo controle e eventual resolução da infecção (FAWAY; ROUVROIT; POUMAY, 2018). Os microconídios de *T. mentagrophytes* levam até doze horas após infecção *ex vivo* de pele humana para interagir com a camada superficial da pele e a germinação ocorre num prazo de até 24 horas (PERES; MARANHÃO; MARTINEZ-ROSSI, 2010). Em um estudo feito em epiderme interfolicular felina reconstruída, a aderência do arthroconídio de *M. canis* começa duas horas pós inoculação, podendo se estender até seis horas da inoculação (CHINNAPUN, 2015).

Metabólitos dos dermatófitos induzem as células hospedeiras a criarem uma resposta imune aos patógenos. Esta resposta está ligada ao grau de infecção do fungo podendo levar a uma resposta inflamatória leve a aguda. A imunidade humoral e celular envolvem a ativação dos linfócitos, macrófagos, neutrófilos e mastócitos no local da infecção (GNAT., 2018b).

O grau de intensidade da resposta imunológica depende do tipo de metabólito, das enzimas liberadas pelo agente e da imunossupressão causada pelo dermatófito. Os antígenos de dermatófitos podem causar uma reação cutânea do tipo Th1 ou tardia tipo IV. A resposta imediata de hipersensibilidade está associada às infecções crônicas recorrentes que produzem altos níveis de imunoglobulina IgE, IgG4 e citocinas Th2 por leucócitos mononucleares. A hipersensibilidade do tipo tardia está associada à dermatofitose aguda. Estudos anteriores relatam que anticorpos IgG, IgA e IgM parecem não proteger nas infecções por dermatófitos porque seres humanos não infectados têm baixos níveis desses anticorpos (CHINNAPUN, 2015).

Suspeita-se ainda que a manana, componente glicoproteico da parede celular dos dermatófitos, esteja envolvida na supressão da resposta inflamatória e na diminuição de

queratinócitos, permitindo assim que uma infecção crônica se estabeleça. Em *T. rubrum* há uma maior quantidade de manana quando comparado a *M. canis*. A partir dessa evidência, pode-se observar uma a reação inflamatória de *M. canis* mais intensa em comparação a *T. rubrum* (PERES; MARANHÃO; MARTINEZ-ROSSI, 2010).

1.3.4 Epidemiologia da dermatofitose por *Microsporum canis*

Ao longo de alguns anos, *M. canis* vem despontando como um agente de dermatofitose de grande importância devido ao seu caráter cosmopolita. O número de infecções por este fungo vem aumentando gradualmente desde o século XX, principalmente devido ao aumento da população de animais de estimação. Na Ásia, em países do mediterrâneo e no centro da Europa, *M. canis* mostra-se muito difundido (ZHAN; LIU, 2016). De acordo com Hayette (2015), é o principal agente causador da tinea capitis e tinea corporis nos países do Mediterrâneo (HAYETTE, 2015).

No Brasil, *M. canis* é mais frequente nas regiões Sul e Sudeste, já nas regiões Norte e Nordeste observa-se uma maior prevalência de *Trichophyton tonsurans* (VEASEY et al., 2017).

Em um estudo realizado em São Paulo por Peres, Maranhão e Martinez-Rossi (2010), 4.500 crianças de 0-15 anos foram avaliadas quanto à ocorrência de tinea capitis no período entre 1996 e 2000. Das 132 crianças com suspeita de doença fúngica, 112 (85%) tiveram a confirmação pela microscopia direta e cultura de *M. canis* (70,5%) e *T. tonsurans* (23,2%), seguidos de *T. mentagrophytes* (3,6%), *N. gypsea* (1,8%) e *T. rubrum* (0,9%). Em um segundo estudo realizado também em São Paulo por Veasey (2017), 67 pacientes com tinea capitis foram avaliados no período de março de 2013 a maio de 2015, com 30 isolamentos positivos para fungos. Na avaliação dos agentes etiológicos encontrados a predominância foi de *M. canis* (56,6%), seguidos de *T. tonsurans* (36,6 %), *N. gypsea* (3,3%), e *T. mentagrophytes* (3,3%). A incidência foi maior em homens (64,17%) e a idade média de 8 anos.

A prevalência de *M. canis* em animais com lesões fúngicas de pele se mostra maior em gatos em relação aos cães, sendo de até 90% nos felinos e 75% nos caninos. A dermatofitose causada por *M. canis* é uma doença heterogênea, com manifestações clínicas variáveis, embora tenha sido observada uma alta incidência de animais infectados de forma

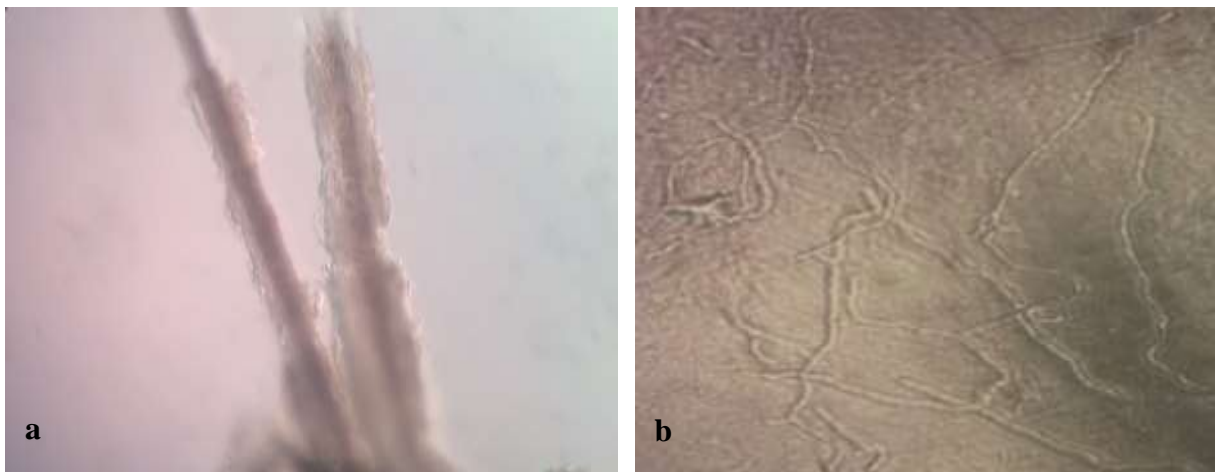
assintomática na última década. Acredita-se que este fato possa estar relacionado a cepas menos virulentas capazes de produzir uma lesão tecidual menos pronunciada ou uma diferente resposta imune dos animais afetados (GNAT et al, 2018b).

Nas regiões sul e sudeste do Brasil, o agente mais frequente de tinha de couro cabeludo é *M. canis*, a contaminação ocorre no ambiente doméstico, devido ao contato com animais infectados. A contaminação antropofílica ocorre por fômites como escovas, travesseiros, brinquedos, entre outros. As tinhas tonsurantes (microspóricas e tricofíticas) podem ser crônicas e caracterizam-se pela descamação do couro cabeludo e tonsura dos pelos.

1.3.5 Diagnóstico Laboratorial do *Microsporum canis*

No exame micológico direto (**Figura 6**) através da utilização de lâminas de vidro e a solução clarificante, hidróxido de potássio (KOH) a 20%, pode-se observar estruturas fúngicas como arthroconídios no interior e ao redor do pelo, indicando o parasitismo ectotrix e presença de hifas hialinas, septadas, ramificadas e arthroconídios no material clínico (RAMOS et al., 2014).

Figura 6. Parasitismo no pelo e na pele de animal por *Microsporum canis*, na microscopia (400x).

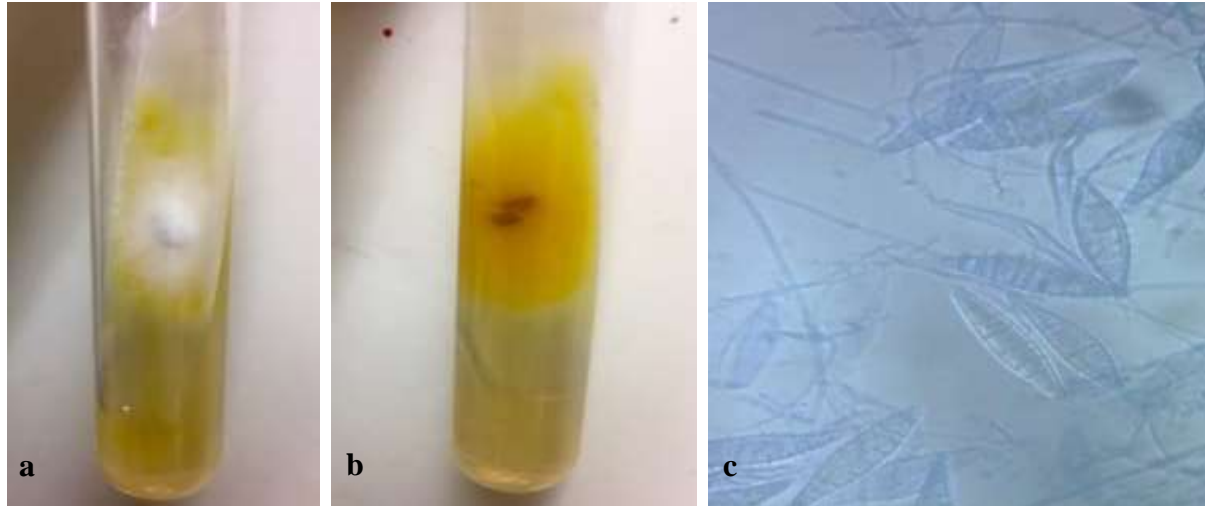


Legenda: a) arthroconídios no interior e ao redor do pelo (parasitismo ectotrix) no pelo de cão. b) hifas hialinas septadas, ramificadas e arthroconídios em raspado de pele de cão.
Fonte: próprio autor.

A identificação da espécie vai depender do exame morfológico micro e macroscópico da colônia (CRUZ, 2010; RAMOS et al., 2014). Na macroscopia, observa-se colônia com micélio aéreo cotonoso, branco (**Figura 7a**) e verso amarelo gema de ovo (**Figura 7b**) e na

microscopia, o fungo apresenta hifas hialinas, septadas e ramificadas e macroconídios fusiformes, de parede espessa, afilados nas pontas, espiculados e com mais de seis divisões celulares em seu interior (**Figura 7 c**).

Figura 7. Aspecto macroscópico e microscópico do *Microsporum canis*



Legenda: a) frente. b) verso da colônia de *M. canis*, cultivada em Ágar Sabouraud dextrose após 10 dias de crescimento na temperatura de 25°C. c) micromorfologia de *M. canis* em lactofenol azul de algodão com a visualização dos macroconídios fusiformes (400X)

Fonte: Próprio autor.

A histopatologia da biópsia de pele é pouco indicada para diagnosticar dermatofitose em pequenos animais e humanos. Os casos mais indicados seriam em presença de nódulos ou feridas não cicatrizantes (Kerion, pseudomicetoma e micetoma) e como diagnóstico diferencial para outras doenças que possam estar associadas, como pênfigo, que muitas vezes apresentam pústulas acantolíticas intradérmicas e dermatite facial. No exame histopatológico, as colorações para fungos como o ácido periódico de Schiff (PAS) e metenamina de prata Grocott-Gomori (GMS) são empregadas para a observação de estruturas fúngicas como hifas e arthroconídios. A coloração histológica não consegue diferenciar as espécies de dermatófitos (MORIELLO et al., 2017).

Métodos de identificação molecular também podem ser utilizados. Marcadores de DNA testados até o momento, incluindo polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), sequenciamento de nucleotídeos do espaçador interno transcrito (ITS) e regiões de espaçadores não transcritos (NTS) de genes de RNA ribossômico (rDNA) e outros, são ferramentas úteis não só para diagnósticos confiáveis, mas também para pesquisas epidemiológicas (GNAT et al., 2018 a). Para tipagem molecular recomenda-se o sequenciamento dos seguintes loci: região ITS, região LSU, gene da beta-tubulina e gene da proteína ribossomal 60S (HOOG et al., 2017).

1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA DOS DERMATÓFITOS

O processo de infecção de *M. canis*, assim como de todos os dermatófitos, envolve adesão à pele do hospedeiro, a capacidade de invasão no tecido e o aparecimento da resposta do hospedeiro. Primeiramente, os dermatófitos invadem o tecido queratinizado e logo a seguir a epiderme. Vários fatores de virulência são secretados pelos dermatófitos durante a fase de invasão, contribuindo para a penetração no tecido, obtenção de nutrientes e melhor adaptação ao meio (ELAVARASHI, KINDO, RANGARAJA, 2017). Enzimas como proteases, lipases, elastase, colagenase, fosfolipases, esterases, hemolisina, queratinase e muitas outras são importantes no processo infeccioso. Essa grande produção de enzimas hidrolíticas caracteriza alguns dos fatores de virulência dos dermatófitos, permitindo a hidrólise dos componentes da pele e propiciando a invasão do patógeno. No tecido do hospedeiro, as macromoléculas são utilizadas como fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre. Dentre as enzimas secretadas pelos dermatófitos, a queratinase é a enzima de maior importância quanto à virulência, uma vez que está altamente envolvida na invasão e utilização do estrato córneo do hospedeiro (CHINNAPUN, 2015; PERES; MARANHÃO; MARTINEZ-ROSSI, 2010).

De acordo com o estudo de Gnat e colaboradores (2018 b), isolados clínicos de dermatófitos de diferentes espécies produzem enzimas em diferentes níveis. O perfil das enzimas de cada espécie de dermatófito é possivelmente dependente de fatores relacionados ao hospedeiro, ao gênero ou à ecologia do fungo.

1.4.1 Proteases

Proteases são consideradas uma das principais classes de enzimas associadas à virulência e secretadas pelos dermatófitos, quando em contato com meio rico em substrato proteico como fonte de nitrogênio. As proteases têm atividade proteolítica capaz de decompor as proteínas em polipeptídios e aminoácidos e são importantes determinantes de virulência para muitos fungos patogênicos (ELAVARASHI et al., 2017). As aspartil-proteases secretadas (Saps) são responsáveis, por exemplo, pela adesão e pelo dano tecidual causado por leveduras do gênero *Candida* tendo como consequência a degradação de proteínas estruturais e imunológicas, tais como as cadeias pesadas de IgG, proteína C3, colágeno e fibronectina (PICHOVA et al., 2001).

Poucos são os relatos sobre as atividades das proteases nos dermatófitos, porém sabe-se que esses fungos são altamente especializados em infectar o estrato córneo, unhas ou cabelos, apresentando uma atividade proteolítica de enzimas secretadas importante para sua virulência. Endo- e exoproteases secretadas por dermatófitos são semelhantes às das espécies do gênero *Aspergillus*. No entanto, em contraste com *Aspergillus* spp., as endoproteases secretadas por dermatófitos são múltiplas e são principalmente membros de duas grandes famílias de proteínas, as subtilisinas (serina proteases) e as fungalisinas (metaloproteases) (RAO et al., 1998). Em *M. canis*, uma importante fungalisina (Mep3), e uma subtilisina principal (Sub3), ambas endoproteases, bem como duas dipeptidil peptidases foram caracterizadas. Entre as subtilisinas, a protease Sub3 é a mais estudada. Sua secreção é fortemente induzida durante o crescimento *in vitro* na queratina felina e a Sub3 nativa mostra uma forte atividade em queratina como substrato. Além disso, embora em alguns dermatófitos genes que codificam proteases diferentes de Sub3 mostraram ser superexpressos *in vivo*. Sub3 de *M. canis* é a única protease secretada por dermatófito em que a produção *in vivo* durante a infecção da pele foi claramente demonstrada. Até o início desta década, nenhuma outra protease produzida por dermatófito foi detectada por imuno-histoquímica, o método mais adequado para a detecção *ex vivo* de proteínas, na epiderme infectada ou estruturas capilares de humanos ou animais. A Sub3 é detectável na superfície de artroconídios e é um fator indispensável na adesão fúngica não apenas na epiderme felina, mas também na epiderme de seres humanos de várias outras espécies animais (BAGUT et al., 2012).

1.4.2 Queratinase

Em todos os fungos dermatófitos, as queratinases são consideradas os principais fatores de virulência com relevância clínica (VIANI et al., 2001).

A queratina possui diversas pontes de dissulfeto entre cisteínas, que são necessárias para a estabilização da proteína. Assim, antes que as proteases queratinolíticas dermatofíticas atuem, pontes de dissulfeto do tecido queratinizado precisam ser reduzidas para sulfeto. As queratinases são especializadas em reduzir estas pontes de dissulfetos. Na presença do sulfeto, a cistina na queratina é quebrada em cisteína e S-sulfocisteína, e assim, proteínas reduzidas tornam-se vulneráveis a hidrólise pelas proteases secretadas (CHINNAPUN, 2015). Fungos dermatófitos, bactérias (espécies de *Bacillus* e *Streptomyces*) produzem queratinase (ELAVARASHI et al., 2017).

Lacaz e colaboradores (2002), relatam que na dermatofitose causada por *M. canis*, a produção de uma enzima extracelular de natureza proteica, chamada Ekase (Extracelular queratinase), afeta diretamente a epiderme, pois é capaz de “destruir” as células escamosas da epiderme. É uma enzima antigênica, podendo ser encontrada na camada epidérmica e no próprio dermatófito, através de teste imunoenzimático (ELISA), com anticorpo policlonal anti-Ekase (LACAZ et al., 2002).

No estudo de Cafarchia e colaboradores (2011) é demonstrado que a queratinase apresentou uma boa produção por isolados de *T. mentagrophytes* em coelhos sintomáticos, assintomáticos e nos isolados obtidos do ambiente.

1.4.3 Elastase

Classificada como uma serina-protease especializada na degradação da elastina. É uma proteína com função estrutural que forma fibras elásticas, com uma importante função na patogênese de outros fungos como em *Aspergillus fumigatus* e provavelmente para os dermatófitos. Em humanos, as cepas de dermatófitos produtoras de elastase causam lesões agudas, enquanto as cepas não produtoras de elastase geram em lesões crônicas (VIANI et al., 2007).

Em relação ao estudo de Viani e colaboradores (2001), cepas isoladas de *M. canis* de cães e gatos sintomáticos e assintomáticos, foram observadas com baixa produção de elastase tanto para o grupo de animais sintomáticos quanto para os assintomáticos. Porém, em estudo posterior do mesmo grupo (2007) com cepas isoladas de *M. canis* em gatos sintomáticos e assintomáticos, foi demonstrada uma alta produtividade da enzima elastase nos gatos sintomáticos em comparação aos gatos assintomáticos.

Na análise de outro grupo foi demonstrado que os isolados de *M. canis* são baixos produtores de elastase, sendo a mesma resposta também encontrada por Cafarchia e colaboradores (2011) mostrando em seu trabalho baixa produção enzimática para elastase em isolados de *T. mentagrophytes* de coelhos sintomáticos, e a não produção desta enzima em isolados de coelhos assintomáticos e do ambiente de acordo com um estudo desenvolvido por Sharizadeh, Shokri e Khosravi (2016).

De acordo com Gnat e colaboradores (2018 b), no que diz respeito à enzima elastase, foi registrado um nível de atividade superior nos isolados de *M. canis* quando comparado aos isolados de *T. mentagrophytes*.

1.4.4 Catalase

A principal atividade da Catalase está na neutralização de peróxidos, ou seja, transformar peróxidos (H_2O_2) em água e oxigênio. Muitos fungos ao serem fagocitados, levam à ativação dos fagócitos e liberação de mediadores químicos participantes do mecanismo oxidativo. Entre estes o peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico exporiam o fungo a um *stress* oxidativo. Entretanto, mecanismos fúngicos de escape, entre os quais produção de catalases as quais atuam na defesa do microrganismo contra o peróxido de hidrogênio, são desencadeados, com ocorrência do processo de multiplicação do fungo dentro dos macrófagos (HANSBERG et al., 2012). Em fungos dermatófitos, seu papel ainda não foi investigado.

1.4.5 Urease

Urease é uma enzima que possui três domínios estruturais e um catalítico. A hidrólise do seu substrato, a uréia, produz amônia e gás carbônico que posteriormente é convertido em bicarbonato. A liberação de amônia em certos ambientes é benéfica para o microrganismo, pois ocasiona o aumento do pH ácido do meio neutralizando-o parcialmente (MOBLEY et al., 1995). Muitos fungos patogênicos como exemplo *Coccidioides posadasii* e *Cryptococcus neoformans* apresentam importante atividade de urease, o que caracteriza esta enzima como importante fator de virulência durante o processo de infecção (COX et al., 2000; MIRBODDONOVAN et al., 2006). Em fungos dermatófitos, seu papel na virulência desses organismos ainda não foi investigado, muito embora a produção de urease nesses fungos tenha sido utilizada por décadas como característica fisiológica importante na sua diferenciação, em especial das espécies *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes* (KANE, FISHER, 1971).

1.4.6 Hemolisina

A produção de hemolisinas tem um importante papel na virulência. Essas proteínas são essenciais para a sobrevivência de microrganismos e estão relacionadas à aquisição de ferro. Este elemento inorgânico é indispensável para o desenvolvimento de microrganismos,

incluindo os fungos, e a capacidade de obtenção deste elemento é primordial para o estabelecimento de um processo infeccioso (NEVITT & THIELE, 2011).

As hemolisinas têm sido descritas como causadores de efeitos citotóxicos nas membranas dos eritrócitos e células fagocíticas, bem como formação de poros e efeitos de lise sobre outras células eucarióticas e estruturas celulares. A hemolisina vem sendo estudada em várias espécies de bactérias, no entanto, hemolisinas produzidas pelo dermatófitos podem desempenhar um papel importante no equilíbrio entre a imunidade celular do hospedeiro e a capacidade do fungo em diminuir a resposta imune (GNAT et al., 2018 b).

1.4.7 Lipases

As lipases são encontradas na natureza em tecidos animais e vegetais e em microrganismos (fungos e bactérias). Os fungos filamentosos possuem a habilidade de crescer em substratos bastante simples e de baixo custo, além da excepcional capacidade de expressar e excretar proteínas. Estas características aliadas ao avanço do conhecimento da fisiologia, bioquímica e genética dos fungos filamentosos tornou possível a exploração de seu imenso potencial para a produção de lipase, assim como outras enzimas de aplicação industrial. Alguns dos fungos produtores de lipase com destacada aplicação comercial são aqueles pertencentes aos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Talaromyces* (*Penicillium*), *Geotrichum*, *Mucor* e *Rhizomucor* (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017).

A lipase é uma enzima que tem uma importante função no estágio inicial da invasão dos dermatófitos ao estrato córneo (CAFARCHIA et al., 2011; SHARIFZADEH; SHOKRI e KHOSRAVI, 2016). No estudo de Cafarchia e colaboradores (2011) foi demonstrado que *T. mentagrophytes* isolados de coelhos sintomáticos, assintomáticos e do ambiente são bons produtores enzimáticos de lipase. Em um estudo comparativo de cepas de fungos dermatófitos isolados de pacientes humanos com formas agudas e crônicas de dermatofitose, foi demonstrada uma maior atividade de lipase em cepas isoladas de infecções crônicas (LOPEZ-MARTINEZ et al., 1994). Cepas de *M. canis* isoladas de pacientes humanos foram produtoras de lipase (SHARIFZADEH; SHOKRI e KHOSRAVI, 2016; ELAVARASHI, KINDO e JAN, 2017). No estudo feito por Viani e colaboradores (2001) cepas de *M. canis* isoladas de cães e gatos com sintomas e assintomáticos também foram produtoras de lipase.

1.4.8 - Dnase

O alto nível da enzima Dnase está relacionada à intensidade do processo inflamatório na pele de humanos (CAFARCHIA et al., 2011). De acordo com Sharifzadeh, Shokri e Khosravi (2016), cepas isoladas de *M. canis* em pacientes humanos são produtoras de Dnase.

O trabalho de Cafarchia e colaboradores (2011) relata haver produção enzimática para Dnase em isolados de *T. mentagrophytes* de coelhos sintomáticos, assintomáticos e do ambiente. Já Viani e colaboradores (2001) relatam que cepas de *M. canis* isoladas de cães e gatos com sintomas e assintomáticos, apresentaram 50% de positividade para esta enzima no grupo de animais sintomáticos.

1.4.9 - Termotolerância

Por fim, um dos fatores que influenciam na virulência de vários fungos patogênicos é a termotolerância, ou seja, a capacidade dos fungos em sobreviver e crescer na temperatura corpórea dos hospedeiros endotérmicos (HOGAN et al., 1996).

De acordo com Kadhim (2015), fatores ambientais desempenham um importante papel no crescimento de fungos queratinofílicos. Todos os fungos possuem uma faixa definida de temperatura dentro da qual crescem e esporulam. Geralmente, a maioria cresce em uma temperatura variando entre 15 e 35°C; outros requerem uma temperatura maior para o seu crescimento. O pH do meio é outro fator importante é que na maioria dos fungos pode variar de 4,2 a 9,3. A medida que os fungos crescem, algumas espécies aumentam o pH do meio e outros diminuem. Os dermatófitos tendem a produzir pH alcalino quando crescendo em meio Sabouraud, isso ocorre devido a desaminação de aminoácidos ácidos e consequentemente formação de amônia.

A termotolerância de isolados de fungos dermatófitos até o momento não foi devidamente estudada. Em outros fungos patogênicos para o homem e para os animais, a termotolerância parece estar envolvida com a patogenicidade. De acordo com o observado, isolados de *Sporothrix* spp. que apresentaram maior termotolerância apresenta uma maior capacidade de disseminação no hospedeiro humano (MESA-ARANGO et al., 2003), e podem

gerar condições mais graves e sinais e sintomas respiratórios nos gatos (BOECHAT et al., 2018).

2. JUSTIFICATIVA

As dermatofitoses estão dentre as principais queixas de dermatologia infecciosa em todo o mundo. Essas infecções, dependendo do agente etiológico (como é o caso do *M. canis*), podem ser transmitidas de um animal infectado ou reservatório natural do fungo para o hospedeiro humano.

Nos últimos anos, o número de animais de estimação nos domicílios brasileiros vem aumentando. De fato, de acordo com um levantamento feito pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil tem a segunda maior população de animais de estimação do mundo, com 22,1 milhões de felinos e 52,2 milhões de cães, entretanto a população de gatos vem se multiplicando em maior proporção e deve predominar em menos de 10 anos (IBGE, 2015). A relação do homem e os animais de companhia, como os cães e gatos, dividindo o mesmo nicho urbano, e o potencial zoonótico destes animais na transmissão de doenças, nos motiva a conhecer melhor a interação destes animais com os dermatófitos (SEGUNDO et al., 2004).

Um dos principais fatores que acarretam em alterações clínicas nas diferentes micoses é a virulência do agente etiológico. Aspectos de virulência são bem estudados em diversos fungos (ALMEIDA-PAES et al., 2015; FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2017; RAMOS et al., 2017), porém pouco é conhecido sobre os aspectos fenotípicos associados à virulência em *M. canis*, como a produção de algumas enzimas hidrolíticas (por exemplo hemolisina e catalase), além do papel da uréase ainda não relatado na patogênese de *M. canis* (AKTAS e YIGIT, 2015). Outro fator relevante é que fungos mais resistentes à variação térmica possuem maior capacidade de invasão, disseminação, além de causar doença com maior grau de gravidade (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

Com tantas lacunas no conhecimento da dermatofitose causada por *M. canis* e o seu potencial em se tornar uma micose emergente, devido ao crescente número de animais de estimação nos domicílios, se faz necessário estudar fatores de virulência que possam favorecer a transmissão e o aparecimento de formas mais graves desta infecção.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Comparar a expressão de enzimas associadas à virulência e, ainda, a termotolerância de isolados de *M. canis* obtidos de animais (cães e gatos) e humanos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a produção de catalase, urease, queratinase, hemolisina e aspártico protease em *M. canis*;
- Determinar a termotolerância de *M. canis*;
- Comparar os fatores associados à virulência entre gatos sintomáticos e assintomáticos;
- Comparar os fatores associados à virulência entre isolados de *M. canis* de animais e seres humanos.

4. MATERIAIS, PACIENTES E MÉTODOS

4.1. APROVAÇÃO ÉTICA

Este projeto foi submetido à Plataforma Brasil para avaliação ética dos Comitês das instituições envolvidas, tendo sido aprovado por ambos: INI/FIOCRUZ (CAAE: 62420416.1.0000.5262) e HUPE/UERJ (CAAE: 62420416.1.3001.5259). Além disso, foi submetido ao Comitê de Ética para o Uso de Animais da Fiocruz (CEUA), para aprovação dos procedimentos realizados com os cães e os gatos, tendo sido aprovado, recebendo a licença LW-9/18.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO

4.2.1 Pacientes humanos

Foram incluídos 14 pacientes com dermatofitose por *M. canis*, confirmados pelo isolamento e identificação do fungo, Sete destes foram provenientes do Laboratório de Micologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HUPE-UERJ) e sete do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz (INI-Fiocruz). Todos os pacientes concordaram em participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). No caso particular dos pacientes menores de idade, o TCLE foi assinado pelo seu responsável legal. Foram excluídos pacientes que utilizaram medicamento antifúngico oral ou tópico nos 30 dias anteriores à realização do exame.

4.2.2 Animais sintomáticos

Foram incluídos animais que apresentavam sinais clínicos como alopecia, eritema, descamações e/ou crostas, com dermatofitose por *M. canis* confirmada por cultura. Além disso, os proprietários ou tutores do animal concordaram com os procedimentos necessários para a coleta de material clínico. Foram excluídos animais que fizeram uso tópico ou oral de medicamento antifúngico nos 30 dias anteriores ao exame, assim como fêmeas gestantes, animais com sinais clínicos de imunodeficiência ou em tratamento de tumores.

4.2.3 Animais assintomáticos

Foram incluídos animais sem os sintomas acima descritos e cujos proprietários ou tutores concordaram com os procedimentos necessários para a coleta do material clínico. Os critérios de exclusão foram os mesmos utilizados para os animais sintomáticos.

4.3. COLETA DE MATERIAL CLÍNICO

4.3.1 Pacientes humanos

Foi realizado raspado da borda da lesão de pele dos pacientes utilizando uma cureta dermatológica estéril e descartável ou com o auxílio de um esculpador Lecron, dependendo da instituição. Nos casos de suspeita de *tinha capitis*, os pelos fragmentados ou tonsurados foram coletados com o auxílio de pinça estéril, além da raspagem da lesão descamativa no couro cabeludo.

4.3.2 Pacientes animais sintomáticos

O material foi coletado utilizando uma lâmina de bisturi estéril para raspar superficialmente as bordas da lesão, recolhendo pelos, material descamativo e crostas. O material foi armazenado entre duas lâminas de vidro, lacrado e identificado com o nome do animal, do veterinário que realizou a coleta, data e local da coleta. O material foi encaminhado ao laboratório de Micologia do INI/Fiocruz para ser analisado.

4.3.3 Pacientes animais assintomáticos

O material foi coletado através da escovação da pelagem do animal em várias direções utilizando uma escova de dente estéril. Após a coleta, essa escova era guardada em saco plástico estéril e encaminhada ao laboratório de Micologia – INI/Fiocruz para posterior análise.

4.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO

O material clínico coletado foi semeado em tubos com rosca contendo os meios Ágar Sabouraud dextrose (SDA) e Ágar Seletivo (Mycosel), e incubado à 25°C (temperatura ambiente) por um período de até três semanas. Fungos com macroscopia compatível com *M. canis* foram repicados em Ágar batata dextrose (*Potato dextrose agar*- PDA) e seus aspectos macroscópicos e microscópicos foram determinados após 10 dias de incubação à temperatura ambiente. A microscopia foi feita com lactofenol azul de algodão e as lâminas visualizadas em microscópio ótico (Zeiss- Axiolab) há 400x.

4.5 PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

As atividades enzimáticas de queratinase, hemolisinas e aspártico-proteases foram mensuradas em placas de Petri contendo o meio de cultura específico para detecção de cada

enzima. Alíquotas de 10 µL de uma suspensão de conídios de *M. canis* em suspensão equivalente à escala 2,0 de Mc Farland (aproximadamente 1×10^8 conídios/ml) foram adicionadas à superfície de cada meio e incubado por sete dias em estufa à 25°C e posteriormente incubadas por um período subsequente de 48 h à 35°C, conforme sugerido por Aktas e Yigit (2014) para o estudo de enzimas hidrolíticas em fungos dermatófitos. O diâmetro da colônia (a) e o diâmetro da colônia mais o halo de revelação de atividade enzimática (b) foram mensurados com uma régua milimetrada. As atividades enzimáticas de cada isolado foram expressas como valor de Pz ($Pz=a/b$). O valor de Pz foi classificado em quatro categorias: atividade enzimática negativa ($Pz = 1$); atividade enzimática baixa (Pz entre 0,700 e 0,999); atividade enzimática moderada (Pz entre 0,400 e 0,699) e atividade enzimática alta (Pz menor que 0,399). De acordo com a definição de Pz, valores baixos significam alta produção enzimática e valores altos indicam baixa produção enzimática (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982). Todos os experimentos foram feitos no mínimo em duplicata, a fim de verificar a reprodutibilidade dos resultados.

4.5.1 Atividade de queratinase

Foi realizada usando o meio de Ágar queratina (queratina azure 0,06%, $MgSO_4$ 0,05%, KH_2PO_4 0,01%, $FeSO_4$ 0,001%, $ZnSO_4$ 0,0005%, NaH_2PO_4 0,386%, Na_2HPO_4 0,397%, Ágar 1,5%), conforme descrito por Cafarchia e colaboradores (2011) com algumas modificações. Resumidamente, a queratina, após ser pesada, foi macerada em nitrogênio líquido para facilitar sua homogeneização em todo o meio de cultura. A seguir, a queratina macerada foi misturada aos compostos diluídos descritos acima em 250 mL de água destilada. Isolados produtores de queratinase apresentaram uma zona azulada ao redor da colônia, que correspondia à liberação do pigmento azul após hidrólise da queratina no meio.

4.5.2 Atividade hemolítica

Foi realizada usando Ágar sangue de carneiro comercial (PlastLabor, Rio de Janeiro, RJ). A presença de um halo translúcido ao redor da colônia após 48h de incubação a 35°C indicou atividade hemolítica positiva (FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2017).

4.5.3 Atividade de aspártico-proteases

Foi realizada utilizando o meio preparado com azoalbumina 0,5 g, *Yeast Carbono Base* (YCB) 2,925g, e 1,5% de Ágar (ALMEIDA-PAES et al., 2015).

4.5.4 Produção de catalase

A produção de catalase foi verificada utilizando culturas das cepas de *M. canis* inoculadas em meio PDA sem inclinação por sete dias em estufa à 25°C e posteriormente incubadas por mais 48 h em estufa à 35°C. Após o período de incubação as culturas foram recobertas com 1 mL de solução contendo peróxido de hidrogênio a 30% e Tween 20 a 1%. Após cinco minutos de reação, a altura da coluna de bolhas foi medida com auxílio de uma régua milimetrada. Meio de cultura não inoculado com fungo foi utilizado como controle negativo. A atividade da catalase foi classificada como alta (coluna de bolhas ≥ 45 mm) ou baixa (coluna de bolhas < 45 mm) (METCHOCK; NOLTE; WALLACE JR, 1999).

4.5.5 Produção de urease

Um volume de 0,5 mL de uma suspensão de conídios de *M. canis* equivalente à escala 2,0 de Mc Farland foi semeado em 4,5 mL de caldo uréia de Chistensen (peptona 0,1%, NaCl 0,5%, KH_2PO_4 0,2%, uréia 2%, glicose 0,1%, vermelho de fenol 0,0016%). Após esse processo, esta suspensão celular em meio de cultivo foi incubada em estufa à 35°C. Ao final de 14 dias os cultivos foram centrifugados a 10.000g e 100 μL do sobrenadante foram transferidos, em triplicata, para uma placa de poliestireno de 96 poços com fundo chato (Corning, Tewksbury, EUA). Isolados de *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32045) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. A absorbância tanto das amostras quanto dos controles foi obtida por espectrofotometria no comprimento de onda de 559 nm utilizado o leitor de microplacas Epoch Biotek (ALMEIDA-PAES et al., 2015).

A atividade enzimática foi classificada como negativa quando a densidade ótica (DO) variou de 0 a 0,099; fraca quando a DO variou de 0,1 a 0,199; média quando a DO variou de 0,2 a 0,499 e forte quando a DO variou de 0,5 a 0,9.

4.6 TESTE DE TERMOTOLERÂNCIA

Alíquotas de 10 µL de uma suspensão de conídios de *M. canis* em suspensão equivalente à escala 2,0 de Mc Farland (aproximadamente 1×10^8 conídios/ml) foram adicionadas à superfície de placas de Petri contendo meio SDA e incubados em estufas na temperatura de 25°C durante 7 dias e depois as mesmas placas foram incubadas mais dois dias na estufa à 35°C. Ao final do período de incubação, o diâmetro das colônias foi medido com o auxílio de uma régua milimetrada. Em seguida, foi calculado o percentual de inibição do crescimento (%IC) através da seguinte fórmula:

$$\%IC = \frac{D_{25} - D_{35}}{D_{25}} \times 100$$

Onde D_{25} e D_{35} são o diâmetro da colônia à 25°C e à 35°C, respectivamente (BOECHAT et al., 2018).

A classificação dos isolados quanto à termotolerância foi expressa da seguinte forma: (1) isolados cujo crescimento foi reduzido de 0 a 33% foram classificados como tendo alta termotolerância; (2) isolados cujo crescimento foi reduzido de 34 a 65% classificados como média; e (3) isolados cujo crescimento foi reduzido de 66 a 100% foram classificados como tendo baixa termotolerância.

4.7 ANÁLISE DE RESULTADOS

Os resultados quantitativos relativos aos fatores associados à virulência (catalase, urease, queratinase, aspártico-protease, hemolisina e termotolerância) obtidos nos diferentes grupos (humanos, cães, gatos assintomáticos e gatos sintomáticos) foram comparados através de testes não paramétricos utilizando programas estatísticos como o R 3.2.3 para Windows.

Também foram estudadas utilizando o mesmo teste as relações entre os diferentes fatores e a apresentação clínica da micose nos felinos (sintomáticos e assintomáticos). A

análise global dos diferentes fatores estudados foi feita através de mapa de calor, onde as cores verde e vermelha simbolizaram baixa e alta expressão de fator, respectivamente. O mapa de calor foi gerado no Software GraphPad Prism 7.0.

5. RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO *Microsporum canis*

5.1.1 Em animais

Foram analisados isolados clínicos de *M. canis* de 12 caninos sintomáticos, 15 felinos sintomáticos e 11 felinos assintomáticos totalizando 38 amostras.

Dos 12 caninos, oito animais eram machos e quatro fêmeas. De acordo com a raça, um animal era da raça Jack Russel, um da raça Pastor de Shetland, um da raça Maltês, um da raça Buldogue Francês e oito animais sem raça definida. Entre os felinos sintomáticos, nove eram machos e seis fêmeas; um da raça Bristsh Longhair, três Persas e 11 sem raça definida. Dos felinos assintomáticos seis eram machos e cinco fêmeas e todos os animais não tinham raça definida.

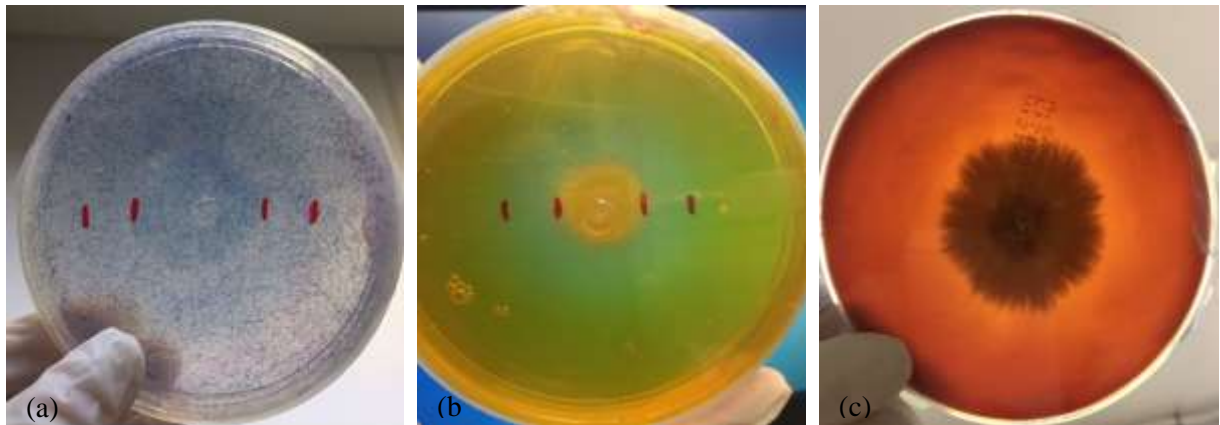
5.1.2 Em humanos

Foram analisadas 14 isolados de *M. canis* de pacientes humanos com dermatofitose. Destes haviam seis mulheres e sete homens; em um deles não houve identificação quanto ao sexo. Quanto à faixa etária, foram analisadas amostras de seis pacientes adultos e cinco crianças; três isolados não tiveram registro quanto à idade. Com referência aos locais de coleta, sete pacientes apresentaram lesões na região do couro cabeludo (*tinea capitis*), dois apresentaram lesão na região abdominal, dois com lesão na região plantar, um com lesão na região palmar, um paciente na região do braço e um na região do dorso.

5.2 PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

Todos os isolados foram capazes de produzir queratinase, protease e hemolisina, conforme evidenciado nos diferentes meios de cultura (**Figura 8**).

Figura 8. Meios de cultura em placa com demonstração da produção enzimática (produção de halo).



Legenda: (a) Placa queratinase. (b) Placa aspártico-protease. (c) Placa hemolisina.
Fonte: Próprio autor

As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com o Pz ($Pz = a/b$). Os valores obtidos do Pz estão descritos nas **Tabelas 1 e 2**.

Tabela 1. Variação dos valores de Pz relacionados às atividades enzimáticas de queratinase, hemolisina e aspártico-protease nos isolados clínicos de *M. canis* em diferentes hospedeiros.

Hospedeiro (N)	Variação do Pz		
	Queratinase	Hemolisina	Protease
Canino (12)	0,50-0,82	0,67-0,87	0,30-0,71
Felino sintomático (15)	0,50-0,79	0,62-0,85	0,37-0,73
Felino assintomático (11)	0,55-0,80	0,67-0,85	0,34-0,85
Humanos (14)	0,45-0,80	0,62-0,87	0,30-0,63

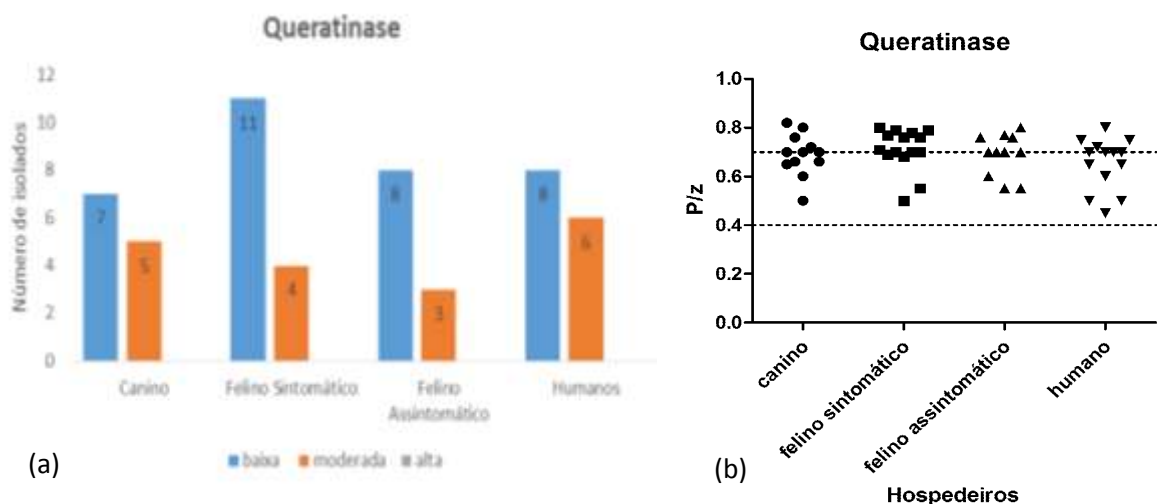
Tabela 2. Média e desvio padrão dos valores de Pz relacionados às atividades enzimáticas de queratinase, hemolisina e aspártico-protease nos isolados clínicos de *M. canis* em diferentes hospedeiros.

Hospedeiro (N)	Média ± Desvio Padrão do Pz		
	Queratinase	Hemolisina	Protease
Canino (12)	0,68 ± 0,08	0,79 ± 0,10	0,49 ± 0,13
Felino sintomático (15)	0,71 ± 0,08	0,76 ± 0,06	0,54 ± 0,12
Felino assintomático (11)	0,69 ± 0,08	0,78 ± 0,06	0,47 ± 0,16
Humanos (14)	0,65 ± 0,10	0,78 ± 0,08	0,48 ± 0,13

Todos os isolados apresentaram atividade enzimática para queratinase, hemolisina e aspártico-protease variando de baixa, moderada ou alta entre os grupos estudados.

Em relação à produção da enzima queratinase, 34 isolados (65,4%) apresentaram baixa atividade enzimática, 18 (34,6%) foram classificados como moderados e nenhum dos isolados apresentaram atividade enzimática elevada conforme apresentado no **Gráfico 1a**. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P=0,4058$) em relação à produção de queratinase entre os diferentes grupos (**Gráfico 1b**). Também não foi verificada diferença significativa entre a queratinase de cepas isoladas de gatos sintomáticos e assintomáticos.

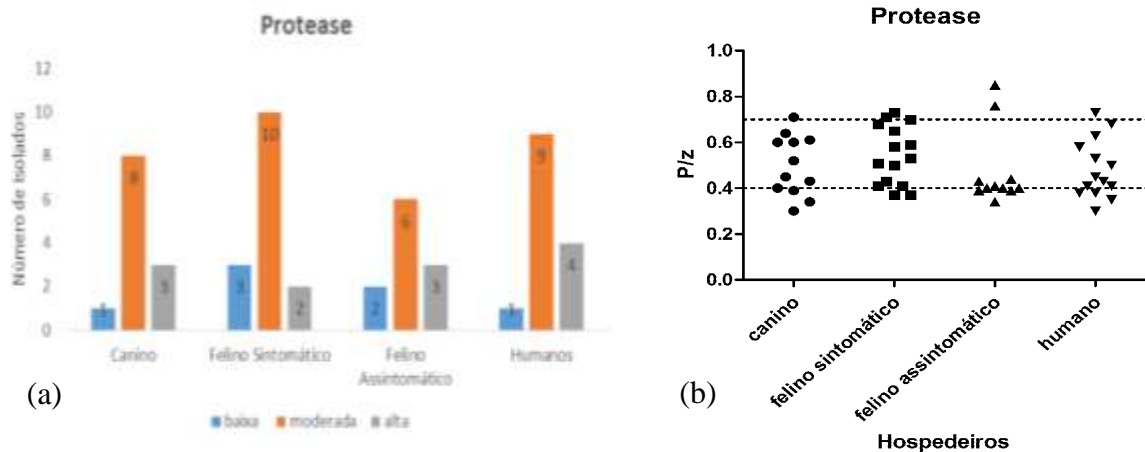
Gráfico 1. Classificação e distribuição de Pz dos isolados de *Microsporium canis* quanto à produção de queratinase.



Legenda: a) Classificação dos isolados de *M. canis* quanto à produção de queratinase. b) Distribuição dos valores de Pz quanto à produção da queratinase. As linhas tracejadas delimitam os valores de mudança de categorização dos valores de Pz.

Na produção de aspártico-protease, 33 (63,5%) dos isolados analisados mostraram-se como moderados produtores desta enzima, sendo sete (13,4%) com baixa produção e 12 (23,1%) classificados como alto produtor, conforme demonstrado no **Gráfico 2a**. Com relação à produção de aspártico-protease entre as cepas de *M. canis* isoladas de diferentes hospedeiros, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos ($P=0,4199$) (**Gráfico 2b**). De forma semelhante, não foi verificada diferença significativa dessa enzima entre as cepas isoladas de gatos sintomáticos e assintomáticos.

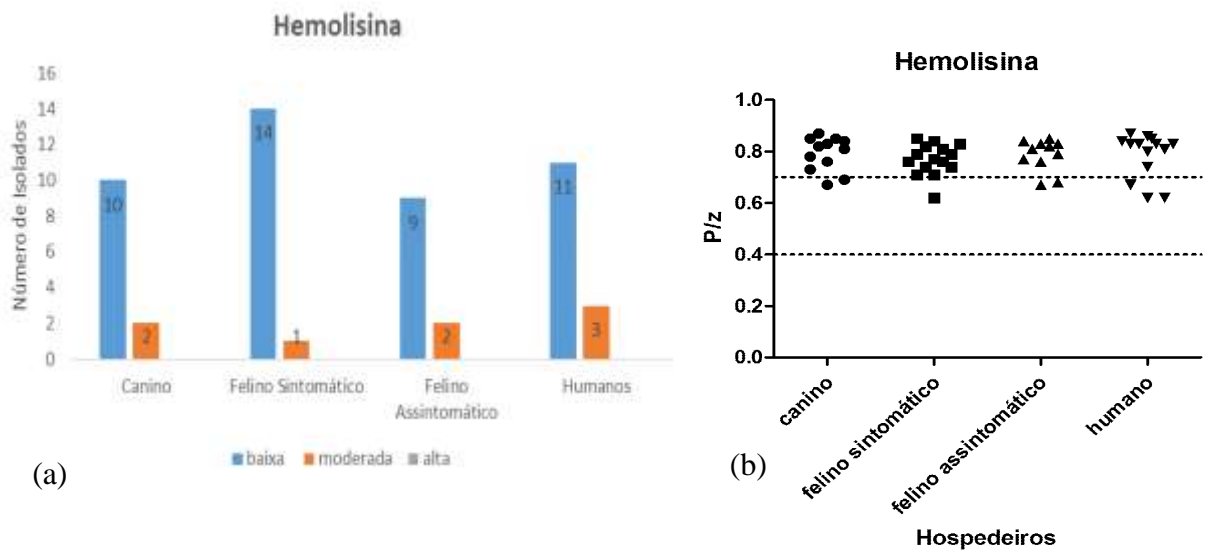
Gráfico 2. Classificação e Distribuição de Pz dos isolados de *Microsporium canis* quanto a produção de Protease



Legenda: a) Classificação dos isolados de *M. canis* quanto à produção de Protease. b) Distribuição dos valores de Pz quanto à produção da protease. As linhas tracejadas delimitam os valores de mudança de categorização dos valores de Pz.

A baixa produção de hemolisina foi observada em 44 (84,62%) dos isolados analisados, e oito (15,38%) classificados como produtores moderados, conforme demonstrado no **Gráfico 3a**. Com relação à produção de hemolisina entre as cepas de *M. canis* isoladas de diferentes hospedeiros, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos ($P=0,5516$) (**Gráfico 3b**), bem como não houve diferença significativa entre a produção de hemolisina de cepas isoladas de gatos sintomáticos e assintomáticos.

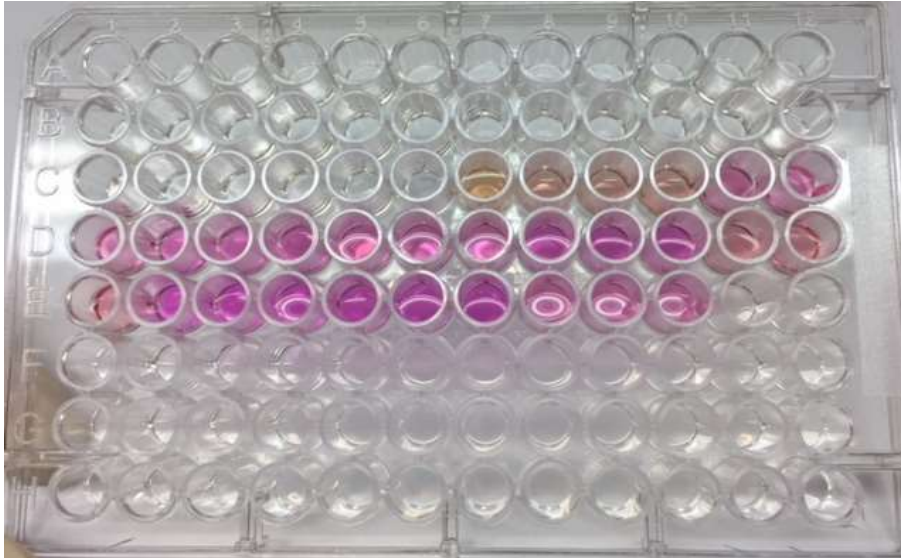
Gráfico 3. Classificação e Distribuição de Pz dos isolados de *Microsporium canis* quanto à produção de hemolisina



Legenda: a) Classificação dos isolados de *M. canis* quanto à produção de hemolisina. b) Distribuição dos valores de Pz quanto à produção da hemolisina. As linhas tracejadas delimitam os valores de mudança de categorização dos valores de Pz.

A produção da uréase, avaliada nos 52 isolados clínicos (animais e humanos), mostrou que 48 (92,3%) dos isolados foram produtores desta enzima (**Figura 9**).

Figura 9. Teste de urease de isolados de *Microsporium canis*



Legenda: Diferenciação de tonalidades do sobrenadante de cultura em meio Caldo Ureia de Christensen de alguns isolados de *M. canis* posicionados dos orifícios C7 a E10 da placa de 96 poços. Com a produção de urease o sobrenadante muda de coloração do amarelo para o rosa.

Fonte: Próprio autor.

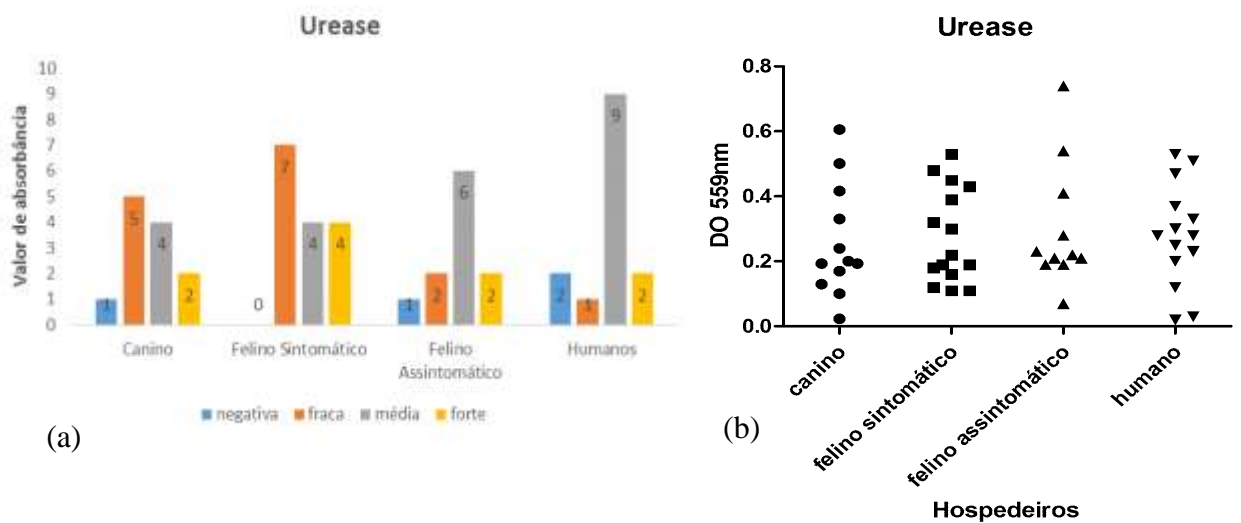
Os resultados obtidos na absorvância em cada espécie de hospedeiro, após 14 dias de incubação na temperatura de 35°C, podem ser observados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Valores de absorvância relacionados às atividades enzimáticas da urease nos isolados clínicos de *M. canis* em diferentes hospedeiros.

Hospedeiros (N)	Varição da Absorbância	Média ± Desvio Padrão da Absorbância
Canino (12)	0,023 a 0,60	0,25 ± 0,17
Felino sintomático (15)	0,11 a 0,53	0,27 ± 0,14
Felino assintomático (11)	0,07 a 0,74	0,29 ± 0,19
Humanos (14)	0,02 a 0,53	0,28 ± 0,15

Os isolados apresentaram atividade enzimática para urease variando de negativa, fraca, média a forte entre os quatro grupos estudados (**Gráfico 4a**). Em relação à produção da enzima urease, os isolados se distribuíram de forma homogênea quanto à DO do sobrenadante da cultura à 35°C e não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P=0,8904$) (**Gráfico 4b**). Também não foi verificada diferença significativa entre a urease de cepas isoladas de gatos sintomáticos e assintomáticos.

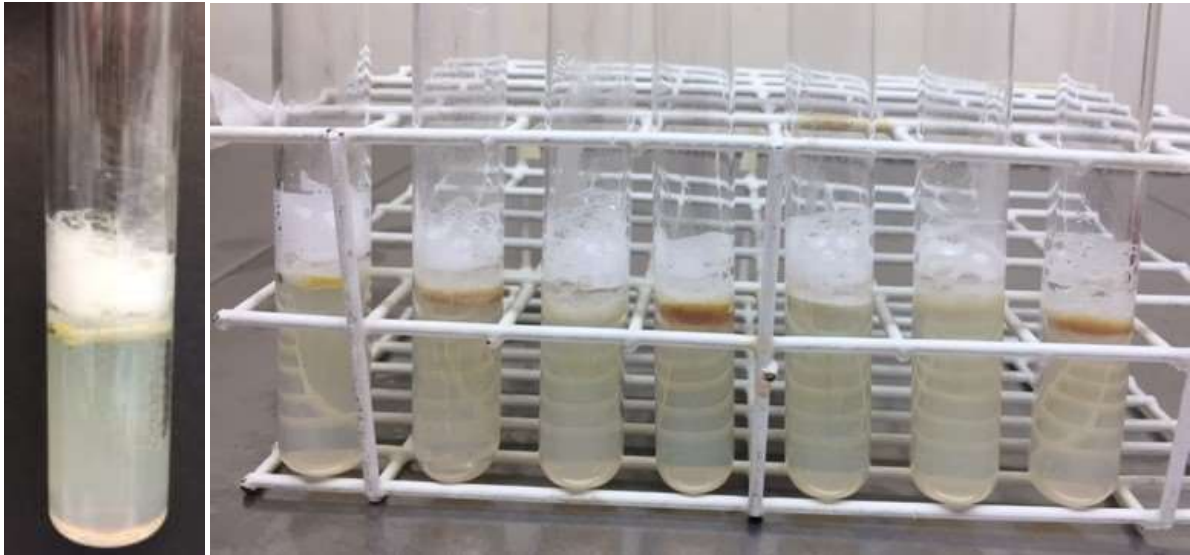
Gráfico 4. Classificação e distribuição de Pz dos isolados de *Microsporium canis* quanto a produção de urease



Legenda: a) classificação dos isolados de *M. canis* quanto à produção de urease. b) Distribuição dos valores de densidade óptica quanto à produção da urease.

A produção de catalase foi verificada pela altura da coluna de bolhas devido à resposta ao stress oxidativo (**Figura 10**).

Figura 10. Culturas dos isolados de *M. canis* inoculadas em meio PDA sem inclinação após adição de peróxido de hidrogênio 30% e tween 20.



Legenda: Diferenças na produção de catalase foram evidenciadas com a altura da coluna de bolhas

Fonte: Próprio autor

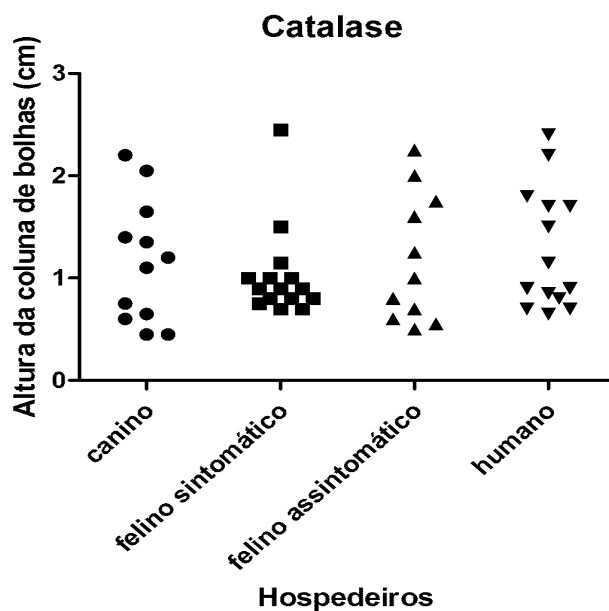
A partir de cinco minutos da produção de bolhas o tamanho da coluna gerada por cada isolado foi medido, conforme **Tabela 4**.

Tabela 4. Valores da altura de bolhas relacionada à atividade enzimática da catalase nos isolados clínicos de *Microsporium canis* em diferentes hospedeiros.

Hospedeiro (N)	Varição da produção de bolhas (cm)	Média ± Desvio Padrão da produção de bolhas
Canino (12)	0,45 a 2,05	1,15 ± 0,60
Felino sintomático (15)	0,70 a 2,45	1,02 ± 0,44
Felino assintomático (11)	0,50 a 2,25	1,18 ± 0,62
Humanos (14)	0,65 a 2,40	1,28 ± 0,59

Todos os isolados apresentaram atividade enzimática para catalase. Porém, como nenhum isolado obteve altura de bolhas superior a 4,5 cm, todos foram classificados como baixos produtores desta enzima. Em relação à resposta da atividade catalase, os isolados se distribuíram de forma heterogênea quanto ao tamanho da coluna de bolhas, conforme mostra no **Gráfico 5a**. Com relação à produção de catalase entre as cepas de *M. canis* isoladas de diferentes hospedeiros, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P=0,8150$). Também não foi verificada diferença significativa entre a catalase de cepas isoladas de gatos sintomáticos e assintomáticos.

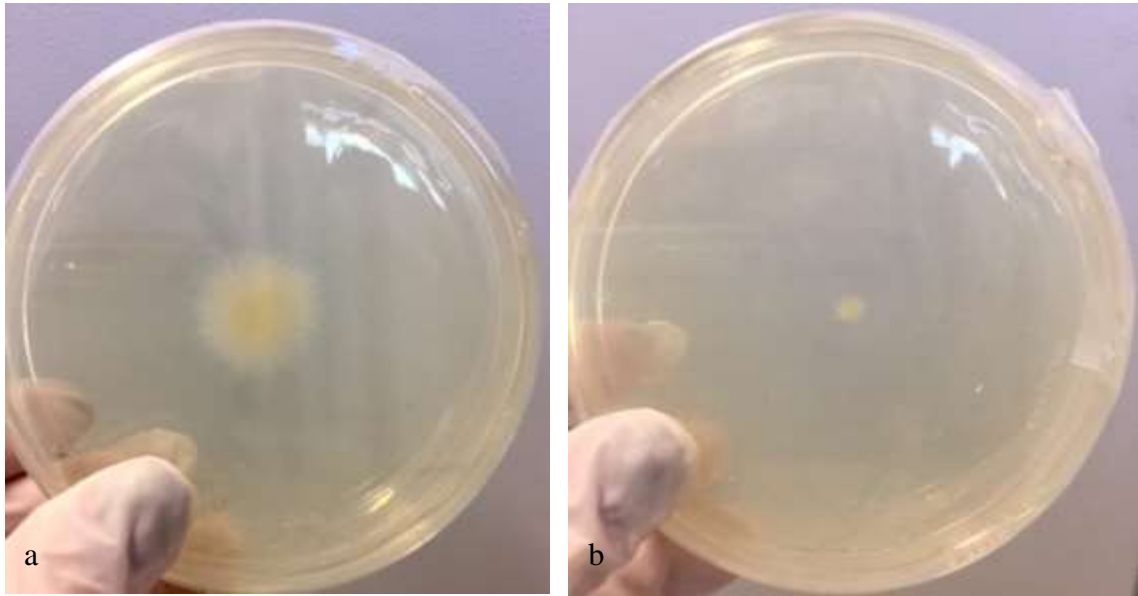
Gráfico 5. Distribuição dos valores da coluna de bolhas dos isolados de *Microsporium canis* em relação à atividade da Catalase.



5.3 TESTE DE TERMOTOLERÂNCIA

A atividade de termotolerância foi avaliada pela comparação do diâmetro das colônias nas temperaturas de 25°C e 35°C conforme apresentado na **Figura 11** e medidos utilizando uma régua milimetrada.

Figura 11 – Cultura fúngica da colônia de *Microsporium canis* em meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol



Legenda: a) Colônia de *M. canis* a 25°C após 7 dias. b) Colônia de *M. canis* a 35 °C após 7 dias.
Fonte: Próprio autor.

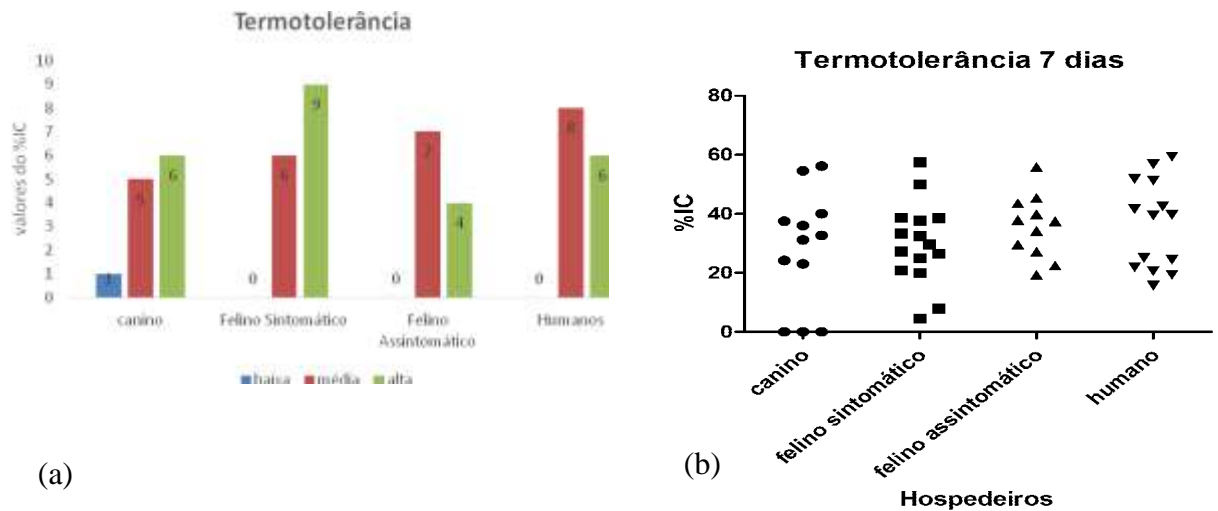
A **Tabela 5** apresenta o percentual de inibição do crescimento (%IC) dos isolados clínicos semeados em placas contendo meio SDA após sete dias de incubação.

Tabela 5. Variação dos valores do percentual de inibição do crescimento após sete dias relacionados à termotolerância nos isolados clínicos de *Microsporium canis* em diferentes hospedeiros.

Hospedeiro (N)	Variação da %IC	Média ± Desvio Padrão da %IC
Canino (12)	0 a 56,19	26,1 ± 23,17
Felino sintomático (15)	4,55 a 57,51	30,01 ± 14,01
Felino assintomático (11)	19,35 a 55,83	35,72 ± 10,68
Humanos (14)	15,63 a 59,36	36,40 ± 15,05

Todos os isolados apresentaram crescimento em cultura nas duas temperaturas e foram classificados como possuindo baixa, média ou alta termotolerância de acordo com a fórmula do percentual de inibição (**Gráfico 6a**). Em relação à resposta dos valores de %IC, os isolados se distribuíram de forma heterogênea, conforme apresentado no **Gráfico 6b**. Com relação à termotolerância entre as cepas de *M. canis* isoladas de diferentes hospedeiros, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P=0,556$). Também não foi verificada diferença significativa entre a termotolerância de cepas isoladas de gatos sintomáticos e assintomáticos.

Gráfico 6- Classificação e distribuição de termotolerância dos isolados de *Microsporium canis*

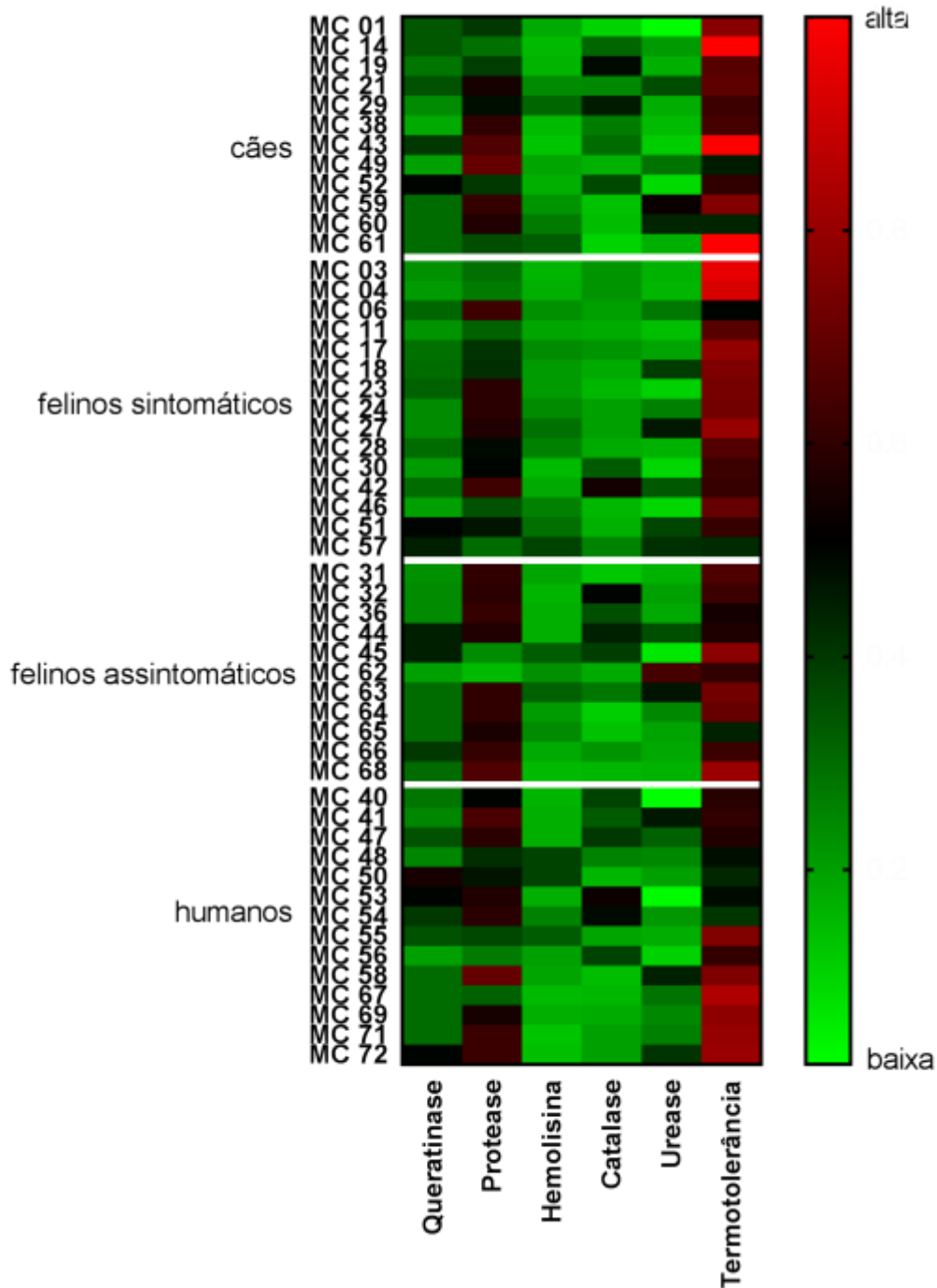


Legenda: a) classificação dos isolados de *Microsporium canis* quanto à termotolerância. b) Distribuição dos valores de %IC indicativos da termotolerância.

5.4 ANÁLISE GLOBAL DA VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS.

Conforme demonstrado no mapa de calor (**Figura 12**), a expressão dos fatores associados à virulência de *Microsporium canis* variou entre os isolados e os diferentes grupos de hospedeiros. De modo geral, os fatores associados à virulência mais expressivos foram a termotolerância, seguida da produção de aspártico-proteases. Nenhum dos isolados mostrou alta expressão para todos os fatores estudados. Por outro lado, os isolados 48 e 57 apresentaram baixa expressão para todos os fatores associados à virulência em estudo.

Figura 12. Comparação de fatores associados à virulência de isolados de *Microsporium canis* incluídos neste estudo.



Legenda: As diferentes cepas estão representadas nas linhas e os diferentes fatores estudados nas colunas do mapa de calor. As cores nas diferentes células representam baixa (verde) ou alta (vermelha) produção dos fatores estudados.

Fonte: Próprio autor.

6. DISCUSSÃO

A dermatofitose é responsável por 3% a 4% dos atendimentos dermatológicos e é a infecção fúngica mais comum em humanos, com uma prevalência estimada em torno de 20% a 25%. O custo anual das despesas envolvidas direta ou indiretamente com o enfrentamento das dermatofitoses é estimado em mais de 500 milhões de dólares gastos mundialmente. (FAWAY; ROUVROIT; POUMAY, 2018).

O dermatófito *M. canis*, por sua característica zoofílica, pode causar doença heterogênea em diferentes hospedeiros apresentando manifestações clínicas variáveis. Nas últimas décadas observa-se uma elevada incidência de animais com formas assintomáticas da dermatofitose, aumentando as chances de infecção para os seres humanos em contato com esses animais (GNAT et al., 2018b). De fato, atualmente há uma preocupação cada vez maior quanto ao controle das zoonoses, pelos órgãos responsáveis em Saúde Pública, pois segundo dados do IBGE, o número de animais em domicílios vem aumentando progressivamente no país, gerando um contato maior entre os animais e o homem e, conseqüentemente, aumentando o número de humanos infectados pela transmissão zoonótica (IBGE, 2015).

A patogênese das dermatofitoses está associada dentre outros fatores à secreção de enzimas que degradam os componentes teciduais infectados. Apesar da interação patógeno-hospedeiro na dermatofitose ainda ser pouco elucidada, uma característica biológica bem conhecida desses fungos é a sua capacidade de invadir tecidos queratinizados, produzindo queratinases como enzimas chave na patogênese (GNAT et al., 2018b). Tem sido demonstrado que as queratinases representam os fatores de virulência mais importantes para os dermatófitos no primeiro estágio da infecção. No entanto, o espectro de enzimas secretadas por esses fungos é mais amplo, e a duração e intensidade da produção enzimática diferem entre as cepas (CAFARCHIA et al., 2011; ELAVARASHI et al., 2017). Nossos resultados corroboram este fato com a apresentação de mais uma classe de enzimas proteolíticas secretadas por *M. canis*, as aspártico-proteases. Devido a estes fatos, acredita-se que um melhor entendimento nos mecanismos fisiopatológicos subjacentes a uma infecção é a base racional para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e profiláticas (GNAT et al., 2018b).

A hipótese inicial do estudo de que as enzimas avaliadas e a termotolerância das cepas de *M. canis* estariam envolvidas na patogenia da dermatofitose nos hospedeiros felinos e na transmissão animal-homem, não foi comprovada de acordo com os resultados observados. Em

nosso estudo, mostramos que apenas três isolados de *M. canis* foram incapazes de produzir urease, contudo, todos os outros isolados avaliados mostraram-se capazes de produzir as enzimas queratinase, protease, hemolisina, catalase e urease *in vitro*, e sobreviver à variação térmica, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre os isolados. Sugere-se então que a produção destas enzimas e a resistência térmica são semelhantes em relação a diferentes cepas de *M. canis*, e que os sinais clínicos de pacientes infectados por este fungo estejam relacionados à imunidade do hospedeiro, ou a outras enzimas não avaliadas neste estudo.

De acordo com Gnat e colaboradores (2018b), os isolados clínicos de diferentes espécies de dermatófitos produzem enzimas com diferentes níveis de atividade. O perfil de enzimas característico de espécies individuais, gêneros ou tipo ecológico dos dermatófitos é possivelmente dependente de fatores relacionados aos hospedeiros. Estes autores destacam ainda que a relação entre cada enzima e a ocorrência de lesões de pele em humanos e animais ou animais assintomáticos variam se a infecção é causada por *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum* ou *M. canis*. Curiosamente, apenas queratinases parecem estar correlacionadas com o aparecimento de infecções por dermatófitos, independentemente das espécies patogênicas.

No estudo de Sharifzadeh, Shokri e Khosravi (2016) realizado com isolados de humanos e diferentes espécies de animais, foi avaliada a atividade enzimática de 60 dermatófitos, incluindo *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis* e *N. gypsea*, mostrando como resultado que todos os isolados avaliados foram capazes de secretar queratinase. De forma semelhante nosso estudo corrobora esses dados, assinalando o *M. canis* como produtor de queratinase, juntamente com outros dados publicados na literatura científica (CAFARCHIA et al., 2011; VIANI et al 2001; VIANI et al., 2007; GNAT et al., 2018 b).

Cafarchia e colaboradores (2011) relatam em seu estudo a resposta enzimática de *M. canis* como marcador de virulência em coelhos de criação, com e sem lesões cutâneas, além de comparar o perfil enzimático com isolados obtidos do ambiente. Houve 100% de produção enzimática de queratinase e lipase, e uma maior produção ($p < 0,05$) de queratinase e Dnase entre os isolados de *M. canis* de coelhos assintomáticos em comparação aos sintomáticos e os obtidos do meio ambiente. Ao contrário, a enzima lipase teve maior produção nos isolados de *M. canis* de animais sintomáticos quando comparados aos assintomáticos e os do ambiente. Não houve produção enzimática de elastase e gelatinase em *M. canis* nos três grupos avaliados (coelhos sintomáticos e assintomáticos, e ambiente). Diferentemente dos resultados de Cafarchia e colaboradores (2011) que mostraram diferença significativa na produção de

queratinase nos isolados de *M. canis* obtidos de coelhos com e sem lesão, nosso trabalho não observou diferença significativa na produção de queratinase entre as cepas de *M. canis* nos isolados de gatos sintomáticos, assintomáticos, caninos e humanos. Sugerimos então que a expressão desta enzima possa estar ligada ao hospedeiro infectado pelo *M. canis*.

De acordo com o relato de Viani e colaboradores (2001), as amostras de *M. canis* isoladas de cães e gatos sintomáticos apresentaram atividade de queratinase maior ($p < 0,05$) que as amostras isoladas de animais assintomáticos. Os autores também inocularam uma cepa de elevada atividade enzimática da queratinase e outra de baixa atividade enzimática em porquinhos da Índia para fins comparativos. A cepa com elevada atividade *in vitro* induziu infecção aguda que se resolveu clinicamente e micologicamente mais rápido do que a cepa com baixa atividade de queratinase. Isso corrobora nossa hipótese de que a influência da queratinase na patogenia da dermatofitose por *M. canis* dependa do tipo de hospedeiro. Este mesmo grupo relata que cepas de *M. canis* isoladas de gatos sintomáticos apresentam alta atividade de queratinase em relação a cepas isoladas de gatos assintomáticos ($p < 0,05$), sugerindo uma relação entre a ocorrência da dermatofitose e a intensidade da produção de queratinase (VIANI et al., 2007). Os resultados apresentados nesse trabalho divergem dos dados dos dois trabalhos descritos acima. Um dos motivos para essa divergência pode ser atribuído às diferentes técnicas utilizadas para determinação da atividade de queratinase, uma vez que Viani e colaboradores (2001) realizaram dosagem de queratinase por espectrofotometria em sobrenadante de cultura contendo fontes naturais de queratina, enquanto no nosso trabalho foi utilizada uma fonte sintética do mesmo substrato em meio sólido, sendo a reação evidenciada a partir da formação de um halo azul ao redor das colônias de *M. canis* correspondendo à liberação do pigmento artificialmente ligado à queratina sintética no momento de sua degradação pela queratinase. Uma segunda hipótese seria a mudança da temperatura de incubação das culturas de *M. canis*, realizada nesse trabalho, onde após sete dias à 25°C, os isolados foram novamente incubados à 35°C, uma temperatura mais semelhante àquela encontrada pelo fungo durante o parasitismo. Segundo Aktas e Yigit (2014), este procedimento melhora a produção enzimática dos dermatófitos. Como os estudos de Viani e colaboradores não incluíam incubação em temperaturas compatíveis com o parasitismo, não é possível prever a produção de queratinase dos isolados destes estudos à 35°C.

Aktas e Yigit (2014) relatam que a questão da atividade hemolítica com consequente capacidade de lisar células vermelhas do sangue também seja sugerida como uma estratégia de sobrevivência para os fungos durante a infecção. Eles avaliaram a atividade hemolítica de

66 dermatófitos isolados de unhas e cabelos de pacientes humanos, e identificaram seis diferentes espécies, sendo cinco de *M. canis*, que não apresentaram atividade hemolítica. Os autores relatam que a produção de hemolisina pode estar ligada à imunidade celular do hospedeiro e à capacidade do fungo em diminuir a resposta imune (AKTAS ; YIGIT, 2014). Analisando de forma comparativa esses resultados com os obtidos no nosso trabalho, todos os isolados de *M. canis* aqui estudados foram produtores de hemolisina, porém com baixa produção. Uma razão que poderia explicar essa diferença seria as diferentes origens geográficas das cepas de *M. canis* utilizadas nos dois estudos, diferença esta que implica não só na distância geográfica, como também em diferenças climáticas entre os dois países. A atividade de hemolisina de *M. canis* parece ser dependente dos fatores do hospedeiro e segundo relatos anteriores, é mais comum em isolados de pacientes humanos (GNAT et al., 2018 b), divergindo dos resultados encontrados no nosso trabalho, onde todos os isolados avaliados, tanto de humanos quanto de animais, foram produtores de hemolisina e mostraram semelhanças na atividade desta enzima. Também não foi verificada diferença significativa entre a atividade hemolítica de cepas isoladas de humanos, gatos sintomáticos e assintomáticos. Esses diferentes trabalhos, juntamente com o nosso, abordando a atividade hemolítica de *M. canis* são concordantes no fato de que este dermatófito não é um excelente produtor de hemolisinas, talvez pelo fato de que, durante o parasitismo, o fungo não esteja exposto continuamente ao sangue do hospedeiro. Conforme Dogen, Gumrale e Iikit (2015) pouco se sabe sobre as atividades hemolítica e co-hemolíticas (CAMP-like) dos dermatófitos, contudo sabe-se que, de acordo com estudos em bactérias, esses componentes desempenham papéis importantes na patogênese. Em um ambiente clínico, a tinea pedis ou a tinea unguium têm o potencial de causar complicações bacterianas graves, como abscesso, celulite, erisipela e fasciitis, sendo essencial entender as diferentes características ecológicas e clínicas dos dermatófitos para compreender melhor suas interações com bactérias. Em seu estudo caracterizando as atividades hemolítica e CAMP-like de 45 cepas de dermatófitos (incluindo os gêneros *Arthroderma*, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*) utilizando Agar Columbia (CA) suplementado com 5% de eritrócitos bovinos, ovinos e equinos, a hemólise foi melhor observada no CA suplementado com eritrócitos ovinos, enquanto que as reações de CAMP-like ocorreram com eritrócitos bovinos e ovinos, mas não com equinos. Foram usadas duas cepas de *M. canis* neste estudo, mas uma delas não produziu hemolisina (DOGEN, GUMRALE e IIKIT, 2015). Comparado ao nosso estudo, observamos produção de hemolisina em todos os isolados de *M. canis*, utilizando meio Ágar sangue de carneiro. Conforme Pakshir e colaboradores (2017), há dados limitados sobre o efeito co-hemolítico

(tipo CAMP) de diferentes espécies bacterianas em espécies de dermatófitos. Em seu estudo, buscou-se avaliar a atividade exoenzimática e o efeito co-hemolítico de quatro bactérias em dermatófitos clínicos isolados de 84 pacientes em Shiraz, Irã. A atividade hemolítica foi avaliada com o meio CA 5% Ágar sangue de carneiro e a atividade proteolítica foi determinada em placas com zona de precipitação, em Ágar gelatina 8% . O fator CAMP-like foi avaliado com quatro bactérias, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus agalactiae*. Como resultado, todos os isolados de *M. canis* assim como os outros dermatófitos, expressaram a zona de hemólise de forma semelhante ao nosso estudo. Todos os isolados tiveram a reação CAMP positiva somente com *S. aureus*. Todos os isolados expressaram atividade proteolítica e não foram observadas diferenças significativas entre os diversos gêneros de dermatófitos e atividade proteolítica. Concluíram então que a atividade hemolisina e enzimas proteolíticas desempenham um papel na patogênese dos dermatófitos e *S. aureus* poderia ser considerado como uma bactéria principal para a criação de efeito co-hemolítico em associação com espécies de dermatófitos. Semelhantemente, os isolados de *M. canis* de gatos sintomáticos e assintomáticos destes estudos não apresentaram diferenças na produção enzimática de hemolisina e de protease. Cabe salientar que as classes de proteases estudadas por nós e por Pakshir e colaboradores (2017) são diferentes. No nosso estudo, foram analisadas as aspártico-proteases, ativas em pH ácido, enquanto as enzimas que degradam a gelatina são metaloprotease. Esses dados demonstram o amplo arsenal de enzimas proteolíticas produzidas por *M. canis*.

Atualmente, um número crescente de proteases secretadas por dermatófitos vem sendo identificadas por técnicas proteômicas ou genômicas, mas seu papel durante a infecção ainda permanece em estudo (BAGUT et al., 2012). A função das proteases secretadas por fungos e sua importância nas infecções é variável. Sabe-se que a secreção de proteases pelos dermatófitos é importante para a virulência desses organismos, entretanto, são raros os estudos comparando proteases isoladas de diferentes dermatófitos. Isto poderia explicar a relativa especificidade dos dermatófitos pelos diferentes sítios queratinizados do hospedeiro (estrato córneo, unhas e cabelo) e as diferentes apresentações clínicas da dermatofitose (MONOD et al., 2002). A capacidade dos dermatófitos para degradar proteínas da pele pode exigir o uso de combinações de diferentes fv , vggproteases específicas (BAGUT et al., 2012). No trabalho de Mignon e colaboradores (1998) foi observada a expressão *in vivo* em *M. canis* de uma Serinoprotease de 31,5-kDa e uma metaloprotease de 43,5-kDa demonstradas em gatos naturalmente infectados e cobaias experimentalmente infectadas. A protease Subtilisina 3 e a metaloprotease são as proteases mais estudadas em *M. canis*. Além disso, embora alguns

dermatófitos possuam genes que codifiquem proteases diferentes de Sub3 e superexpressas *in vivo*, a Sub3 de *M. canis* foi a primeira protease secretada por dermatófitos onde a produção *in vivo* durante a infecção da pele foi claramente demonstrada (MIGNON et al., 1998). Devido à existência de trabalhos já relatados com serina protease e metaloprotease (que atuam preferencialmente em pH básico), realizamos nossa busca de protease em *M. canis* em meio preparado especificamente para demonstrar a resposta do tipo aspártico-protease. De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, *M. canis* mostrou-se capaz de produzir a enzima aspártico protease.

Mathy e colaboradores (2010), no seu estudo compararam a transcrição dos genes da fungalisina e da dipeptidil peptidase (DPP) de *M. canis* em quatro cepas isoladas de gatos sintomáticos e assintomáticos durante os primeiros passos do processo infeccioso, a adesão dos artroconídios aos corneócitos. Foi usado um novo modelo *ex vivo* da epiderme felina, onde não houve transcrição detectável dos genes da fungalisina em artroconídios durante os primeiros passos do processo de infecção para qualquer uma das cepas testadas, sugerindo que essas proteases desempenham um papel mais tardio no processo de infecção. Já o gene DPP IV foi transcrito com maior frequência nos artroconídios nos diferentes momentos da infecção (adesão e invasão), mas não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens de *M. canis* isoladas de gatos sintomáticos e assintomáticos. Este estudo mostrou que o aspecto clínico da dermatofitose felina por *M. canis* depende de fatores relacionados ao hospedeiro e não à atividade proteolítica da cepa fúngica infectante (MATHY et al., 2010). Este resultado foi similar aos resultados que encontramos na produção enzimática da aspártico-protease em cepas de *M. canis* isolados de gatos sintomáticos e assintomáticos. Os fungos patogênicos de uma maneira geral contêm uma família de genes que codifica a Aspártico-protease, como por exemplo, *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (MONOD et al., 2002). Nos dermatófitos, esse é um campo pouco explorado. No trabalho de Figueiredo-Carvalho e colaboradores (2017), foi avaliada a produção enzimática da aspártico-protease em *Candida glabrata*, onde a maioria dos isolados foram classificados como bons produtores (Pz variando de 0,400 a 0,583). No nosso estudo, a maioria das cepas isoladas de *M. canis* foram moderadas produtoras desta enzima, mostrando que este fungo também apresenta atividade proteolítica em meio ácido. Novos estudos são necessários para melhor entender o papel e a produção de aspártico-proteases por dermatófitos.

A catalase desempenha uma função antioxidante, sendo capaz de converter o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que é letal para o fungo, em água (H₂O) e oxigênio (O₂), permitindo assim o escape do fungo da resposta imune do hospedeiro (NAKAMURA et al., 2012). De

acordo com o estudo de Figueiredo-Carvalho e colaboradores (2017), a catalase foi expressa por todos os isolados de *C. glabrata stricto sensu*. Isso reforça a importância deste mecanismo enzimático do fungo para sua manutenção no organismo, principalmente em quadros sistêmicos. Em relação ao nosso estudo, *M. canis* foi produtor de catalase, embora o fungo esteja relacionado às lesões mais superficiais. Devido à ausência de estudos sobre a produção de catalase por dermatófitos, é necessário verificar a expressão desse fator por outras espécies, de preferência isoladas de diferentes hospedeiros.

Conforme Mirbod-Donovan e colaboradores (2006), a urease representa um importante fator de virulência para *Coccidioides posadasii* aumentando o pH do ambiente exterior ao redor das esférulas, contribuindo para a lesão tecidual e aumento da infecção. O estudo feito por Almeida-Paes e colaboradores (2015), onde foi avaliada a associação das características fenotípicas e a virulência de isolados clínicos do gênero *Sporothrix* mostrou que as cepas de *S. brasiliensis* apresentaram maior expressão de urease em comparação ao *S. schenckii*, e esta produção foi altamente variável entre os isolados. Como a expressão da urease foi maior em pacientes que apresentaram regressão espontânea da esporotricose, foi sugerido que esta enzima tenha a capacidade de ativar o sistema imune, auxiliando na resolução da doença sem tratamento antifúngico. No presente estudo foi avaliada a produção de urease pelo *M. canis* que mostrou uma produção enzimática classificada de média à fraca. Resposta esta que pode estar ligada ao fato deste fungo causar lesões mais superficiais quando comparado ao *S. brasiliensis* (agente de micose subcutânea), com menor resposta imunológica. Novamente, como não há estudos sobre o papel da urease por dermatófitos durante o processo infeccioso, são necessários mais estudos para melhor compreender o papel desta enzima na dermatofitose.

Em relação à termotolerância, o estudo feito por Almeida-Paes e colaboradores (2015), mostrou que a resistência a variação térmica dos isolados de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* são semelhantes. A termotolerância de *S. brasiliensis*, considerada uma das espécies mais virulentas, parece não estar relacionada às formas clínicas. Fato este, que se assemelha ao desse estudo, onde não foi observada diferença significativa entre os isolados de *M. canis* em relação à termotolerância, não mostrando relação com a patogenia do hospedeiro. De forma contrária, Boechat e colaboradores (2018) puderam associar quadros mais graves de esporotricose em hospedeiro felino a cepas consideradas mais termotolerantes. Nesse trabalho, apesar da ausência de estudos sobre esse tema em dermatófitos, a termotolerância foi considerada o fator associado à virulência mais significativo dentre todos os outros estudados

em *M. canis*. Por isso, novos estudos devem ser encorajados sobre terotolerância em dermatófitos.

De acordo com Faway e colaboradores (2018), os equivalentes de pele humana representam um modelo ideal para estudar os mecanismos patogênicos da dermatofitose humana, como adesão, invasão e ruptura da barreira epidérmica. Melhorias adicionais, especialmente no desenvolvimento da cultura com células imunes, ampliariam sua relevância para o contexto humano *in vivo*. O entendimento do processo infeccioso e das respostas teciduais tem sido impedido por discrepâncias entre observações *in vivo* ou em modelos de pesquisa. Os modelos animais carecem de relevância para o estudo da dermatofitose humana devido a diferenças específicas de espécies no desenvolvimento de lesões e respostas inflamatórias. Diversos modelos experimentais foram desenvolvidos para caracterizar os mecanismos pelos quais os dermatófitos invadem os tecidos do hospedeiro, para entender a resposta imune e avaliar a eficácia. Paralelamente, modelos animais *in vivo*, como cobaia ou camundongo, foram explorados. No entanto, a gravidade das lesões e a extensão das respostas inflamatórias variam consideravelmente de acordo com o hospedeiro e as espécies de dermatófitos. Assim, um modelo *in vivo* consistente de infecção deve ser desenvolvido usando o hospedeiro nativo (FAWAY; ROUVROIT; POUMAY, 2018).

Uma das limitações deste trabalho foi a avaliação da expressão de todos os fatores terem sido feita exclusivamente *in vitro*, dificultando a comparação do que ocorre durante o processo infeccioso, além da falta de padronização das técnicas de detecção das diferentes enzimas em fungos dermatófitos, tornando-se urgente a formulação de um protocolo de referência sugerido pela comunidade científica.

A fisiopatologia da lesão fúngica provavelmente varia de acordo com as espécies de dermatófitos, das espécies de hospedeiro e seu estado imunológico (VIANI et al. 2001; CAFARCHIA et al. 2012; GNAT et al., 2018). A produção de enzimas secretadas pelos dermatófitos está relacionada à sobrevivência fúngica, a evolução clínica da infecção, mas possivelmente também ao desencadeamento e modulação à resposta imunológica (DOGEN et al. 2015, ELAVARASHI et al., 2017). De acordo com nosso trabalho, *M. canis* se apresentou com resposta enzimática semelhante em diferentes hospedeiros, independente da presença de lesões no hospedeiro felino. Estudos em outros centros, com o intuito de aumentar o número de isolados testados, podem contribuir para esclarecer se este é de fato um comportamento padrão de *M. canis*, independente da região geográfica e do hospedeiro que ele infecte.

7 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que os isolados de *M. canis* foram capazes de produzir *in vitro*, queratinase, aspártico-protease, hemolisina, urease, catalase e serem termotolerantes, havendo semelhança na expressão desses fatores independente da espécie do hospedeiro.

Concluimos que a tais fatores não estejam associados à instalação do *M. canis* de animais para humanos, nem na sintomatologia apresentada pelos gatos infectados por este dermatófito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTAS, E.; YIGIT, N. Hemolytic activity of dermatophytes species isolated from clinical specimens. **J. Mycol Med**, Paris, n. 25, p 25-30, 2015.

ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, L.C.; OLIVEIRA, M.M. et al. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. **BioMed Res. Int.**, New York, v.2015, p.1-10, 2015.

ANGARANO, D.; SCOTT, D. Use of ketoconazole in treatment of dermatophytosis in a dog. **J Am Vet Med Assoc.** v.1, p. 434, 1987.

BALDA, A.C.; LARSSON, C.E.; OTSUKA, M. et al. Estudo Retrospectivo de Casuística das Dermatofitoses em Cães e Gatos Atendidos no Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. **Acta Sci Vet**, Porto Alegre - Brasil, v.32, n.2, p.133-140, 2004.

BAGUT, E.T.; BALDO, A.; MATHY, A. et al. Sub 3 is involved in adherence of *Microsporum canis* to human and animal epidermis. **Vet Microbiol**, 3-4 ed. Amsterdam: Elsevier Science, v. 160, p. 413-419, 2012.

BIANCHI, M.V.; LAISSE, C.J.M.; VARGAS, T.P. et al. Intra-abdominal fungal pseudomycetoma in two cats. **Rev Iberoam de Micol**, Barcelona - Espanha, v.34, n.2, p.112-115, 2017.

BOECHAT, J.S.; OLIVEIRA, M.M.E.; ALMEIDA-PAES, R. et al. Feline sporotrichosis: associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic área. **Mem do Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro - Brasil, v.113, n.3, p.185-196, 2018.

CAFARCHIA, C.; FIGUEREDO, L.A.; COCCIOLI, C. et al. Enzymatic activity of *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes* from breeding rabbits with and without skin lesions. **Mycoses**, Berlin - Alemanha, v.55, p.45-49, 2011.

CERUNDOLO, R. Generalized *Microsporum canis* dermatophytosis in six Yorkshire terrier dogs. **Vet Dermatol**. Inglaterra, v.15:p.181– 187, 2004.

CHINNAPUN, D. Virulence Factors Involved in Pathogenicity of Dermatophytes. **Walailak J Sci Technol**, Tailândia, v.12, n.7, p.573-579, 2015.

CHEN, C.; SU, B. Concurrent hyperadrenocorticism in a miniature schnauzer with severe *Trichophyton mentagrophytes* infection. **Vet Dermatol**. Inglaterra, v. 13, p.211–229, 2002.

CORTEZ, D.V.; CASTRO, H.F.; ANDRADE, G.S.S. Potencial catalítico de Lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processo de biotransformação. **Quim Nova**, SP-Brasil, v.40, n.1, p.85-96, 2017.

COX, G.M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G.T. et al. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect Immun**, Washington D.C. - USA, n.68, p.443-448, 2000.

CRUZ, L.C.H.; **Micologia Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2010.

DOGEN, A.; GUMRAL, R.; IILIT, M. Haemolytic and co-haemolytic (camp-like) activity in dermatophytes. **Mycoses**, Berlin - Alemanha, v.58, p.40-47, 2015.

ELAVARASHI, E; KINDO, A.J; RANGARAJA, S. Enzymatic and Nonenzymatic Virulence Activities of Dermatophytes on Solid Media. **J. Clin. Diagn. Res.**, India, v.11, n.2, p.23-5, 2017.

FARIAS, M.R.; CONDAS, L.A.Z.; RAMALHO, F. et al. Avaliação do estado de carreador assintomático de fungos dermatofíticos em felinos (*Felis catus* – linnaeus, 1793) destinados a doação em centros de controle de zoonoses e sociedades protetoras de animais. **Braz J. Vet Res Anim Sci**, SP - Brasil, v.18, n.2, p.306-312, 2011.

FAWAY, É.; ROUVROIT, C.L.; POUMAY, Y. In vitro of dermatophyte infection to investigate epidermal barrier alterations. **Clin Exp Dermatol**, Oxford - Inglaterra, v.27, p. 915-922, 2018.

FIGUEIREDO-CARVALHO, M.H.G.; RAMOS, L.S.; BARBEDO, L.S. et al. Relationship between the antifungal susceptibility profile and the production of virulence-related hydrolytic enzymes in Brazilian clinical strains of *Candida glabrata*. **Mediators Inflamm**, Oxford - EUA, v.2017, ID 8952878, p.1-10, 2017.

GNAT, S.; LAGOWSKI, D.; NOWAKIEWICZ, A. et al. Tinea corporis by *Microsporum canis* in mycological laboratory staff: Unexpected results of epidemiological investigation. **Mycoses**, Berlin - Alemanha p. 1-9, 2018 a.

GNAT, S.; LAGOWSKI, D.; NOWAKIEWICZ, A. et al. Phenotypic characterization of enzymatic activity of clinical dermatophyte isolates from animals with and without skin lesions and humans. **J Appl Microbiol**, Oxford - Inglaterra, v.125, p. 700-709, 2018 b.

HALL, E.; MILLER, W.; MEDLEU, L. Ketoconazole treatment of generalized dermatophytosis in a dog with hyperadrenocorticism. **J Amer An Hosp Assoc**. v.20, p.597–602, 1984.

HANSBERG, W.; SALAS-LIZANA, R.; DOMÍNGUEZ, L. Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure. **Arch. Biochem. Biophys.**, NY- EUA, v. 525, n.2, p. 170-180, 2012.

HAYETTE, M.; SACHELLI, R. Dermatophytosis, Trends in Epidemiology and Diagnostic Approach. **Curr Fungal Infect Rep**, Filadelfia - EUA, v. 9, p. 164-179, 2015.

HNILICA, K. A. **Dermatologia de Pequenos Animais: Atlas Colorido e Guia Terapêutico**. 3^a ed. - Rio de Janeiro: Elsevier, p. 632, 2012.

HOGAN, L.H.; KLEIN, B.S.; LEVITZ, S.M. Virulence factors of medically important fungi. **Clin Microbiol Rev**, Washington D.C – EUA, n. 9, p.469-488, 1996.

HOOG, G.S.; DUKIK, K.; MONOD, M. et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia**, Netherlands, v.182, p.5-31, 2017.

IORIO, R; CAFARCHIA, G.; CAPELLI.; et al. Dermatophytoses in cats and humans in central Italy: epidemiological aspects. **Mycoses**, Alemanha, v.50, p.491-495, 2007.

IBGE, Pesquisa Nacional de Saúde: Acesso e Utilização dos Serviços de Saúde, Acidentes e Violências. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro: IBGE, 2015

KADHIMA, S.K; AL-JANABIA, J.K; AL-HAMADANIB, A.H. Determination of Optimal Conditions of Growth and Proteolytic Activity of Clinical Isolates of *Trichophyton rubrum*. **J Contemp Med Sci**. Iraque. v.1, n.3, p 9-19, 2015.

KANE, J; FISHER, J.B. The differentiation of *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* by use of Christensen's urea broth. **Can J Microbiol**. Ottawa- Canadá, v. 17, p. 911-913, 1971.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Dermatophytoses. In:_____. **Medical Mycology**. Philladelphia: Lea & Febiger,. Cap 6, 1992, p. 105-161.

LACAZ, C.S; PORTO, E; MARTINS, J.E.C; HEINS-VACCARI, E.M; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. In:_____ .Micoses Superficiais. 9 ed. São Paulo: Savier, 2002, p. 270 – 285.

LOPEZ-MARTINEZ, R; MANZANO-GAYOSSO P; MIER, T. et al. Exoenzymes of dermatophytes isolated from acute and chronic tinea. **Rev Latinoam Microbiol**, v.36, n.1, p. 17-20, 1994.

MACKAY, B.; JOHNSTONE, I.; OBOYLE, D. et al. Severe dermatophyte infections in a dog and cat. **Aust Vet Pract**. v.27, p. 86–90, 1997.

MATHY, A.; BALDO, A.; SCHOOF, L. et al. Fungalysin and dipeptidyl-peptidase gene transcription in *Microsporum canis* strains isolated from symptomatic and asymptomatic cats. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.146, p.179-182, 2010.

METCHOCK, B.; NOLTE, F.; WALLACE JR., R. MYCOBACTERIUM. In: **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. p. 399–437, 1999.

MESA-ARANGO A. C; DEL, R. R. M; PÉREZ-MEJIA, A. et al. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of Sporotrichosis. **J Clin Microbiol.** v.40, n.8, p. 3004-3011, 2002.

MIGNON, B.; SWINNEN, M.; BOUCHARA, J.P. et al. Purification and characterization of a 315 KDa Keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporium canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. **Med. Mycol.**, Oxford- Inglaterra, v.36, p. 395-404, 1998.

MIRBOD-DONOVAN, F.; SCHALLER, R.; HUNG, C.Y. et al. Urease Produced by *Coccidioides posadasii* Contributes to the Virulence of This Respiratory Pathogen, **Infect Immun**, Washington D.C – EUA, v. 74 p. 504–515, 2006.

MOBLEY, H.L.T.; ISLAND, M.D.; HAUSINGER, R.P. Molecular Biology of Microbial Ureasas. **Microbiol Rev**, Washington D.C, p 451–480, 1995.

MONOD, M.; CAPOCCIA, S.; LÉCHENNE, et al. Secreted proteases from pathogenic fungi. **Int J Med Microbiol**, Alemanha, v.292, p. 405-419, 2002.

MORIELLO, K.A.; COYNER, K.; PATERSON, S. et al. Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats. **Vet Dermatol**, Inglaterra, v. 28, p. 266-268, 2017.

NAKAMURA, K.; KANNO, T.; MOKUDAI, T.; IWASAWA, A.; NIWANO, Y.; KOHNO, M. Microbial Resistance in Relation to Catalase Activity to Oxidative Stress Induced by Photolysis of Hydrogen Peroxide. **Microbiology and Immunology**, v. 56, n. 1, p. 48–55, 2012.

NEVITT, T.; THIELE, D.J. Host iron withholding demands siderophore utilization for *Candida glabrata* to survive macrophage killing. **PLoS pathog**, São Francisco – EUA, n. 7, p.1-15, 2011.

PARKSHIR, K.; MOHAMAD, T.; KHODADAI, H.; et al. Proteolytic activity and cooperative hemolytic effect of dermatophytes with diferente species of bactéria. **Curr Med Mycol**, Iran, n.2, v.4, p. 9-14, 2017.

PERES, N.T.A; MARANHÃO, F.C.A; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Dermatofitos: Interação Patógeno-Hospedeiro e Resistência a Antifúngicos. **An Bras Dermatol**, RJ - Brasil, v.85, n.5, p.657-667, 2010.

PICHOVA, I; PAVLICKOVA, L.; DOSTAL, J. et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida prapsilosis* and *Candida lusitaniae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. **Eur J Biochem**, Inglaterra, v.268, p.2669-2677, 2001.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate Method for Detection of Phospholipase Activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 7–14, 1982.

RAMOS, M.L.M.; SILVA, I.C.; DIAS, C.M.P. et al. Isolamento e identificação de fungos em cães com dermatopatias. **Revista de Educação Continuada em Dermatologia d Alergologia Veterinária**, v.3, n.8, p.79-83, 2014.

RAMOS, L.S.; BRANQUINHA, M.H.; SANTOS, A.L. Different classes of hydrolytic enzymes produced by multidrug-resistant yeasts comprising the *Candida haemulonii* complex. **Med Mycol**, Oxford – Inglaterra, v.55, n.2, p.228-232, 2017.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiol mol biol rev**, Washington – EUA, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.

SEGUNDO, C.; MARTINEZ, A.; ARENAS, R. et al. Dermatocicose por *Microsporium canis* en humanos y animales. **Rev Iberoam Micol**, Barcelona, v.21, p.39-41, 2004.

SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A. R. In vitro evaluation of antifungal susceptibility and keratinase, elastase, lipase and Dase activities of different dermatophyte species isolated from clinical specimens in Iran. **Mycoses**, Alemanha, v. 59, p. 710-719, 2016.

VIANI, F.C.; SANTOS, J.I.; PAULA, C.R. et al. Production of extracellular enzymes by *Microsporium canis* and their role in its virulence. **Med Mycol**, Inglaterra, v.39, p.463-468, 2001.

VIANI, F.C.; VIANI, P.R.C.; RIVERA, I.N.G. et al. Extracellular proteolytic activity and molecular analysis of *Microsporum canis* strains isolated from symptomatic and asymptomatic cats. **Rev Iberoam Micol**, Barcelona, v.24, p. 19-23, 2007.

VEASEY, J.V.; MAYOR, S.A.; MURAMATU, L.H. et al. Epidemiological profile of tinea capitis in São Paulo city. **An Bras Dermatol**, RJ - Brasil, v.92, n.2, p. 283-284, 2017.

WANG, R.; WANG, X.; LI. Imagem Gallery: Dermatophytic pseudomycetoma caused by *Microsporum canis*. **Br J of Dermatol**, Oxford – Inglaterra, v.178, p. 228, 2018.

WU, L. C.; SUN, P.L; CHANG, Y.T. Extensive deep dermatophytosis cause by *Trichophyton rubrum* in patient with liver cirrhosis and chronic renal failure. **Mycopathologia**, Netherlands, v.176, n.5-6, p. 457- 462, 2013.

YU, J.; WAN, Z.; CHEN, W. et al. Molecular typing study of the *Microsporum canis* strains isolated from an outbreak of tinea capitis in a school. **Mycopathologia**, Netherlands, v.157, p.37-41, 2004.

ZAITZ, C. Dermatofitoses. *In*: ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; et al. **Compêndio de micologia médica**. 2ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 157-167, 2010.

ZHAN, P.; LIU, W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide. **Mycopathologia**, Netherlands, doi 10.1007/s11046-016-0082-8, 2016.

ZUR, G.; WHITE, S.D. Hyperadrenocorticism in 10 dogs with skin lesions as the only presenting clinical signs. **J Amer An Hosp Assoc**. v.47, p.419–427, 2011.

ANEXO 1**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

De acordo com as normas da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde

Pesquisadores Responsáveis:

Rodrigo de Almeida Paes
Laboratório de Micologia – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos Tel: (21) 3865-9642

Rosane Orofino Costa
Laboratório de Micologia – Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ
Av. 28 de Setembro, 77 2º andar – Vila Isabel. Tel: (21) 2868-8203

Você (ou seu filho) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa que tem como título “Análise comparativa de fatores associados à virulência de isolados clínicos de *Microsporium canis* de origem humana e animal”, realizada em cooperação do Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ com a Fundação Oswaldo Cruz. O objetivo desse trabalho é estudar como o fungo *Microsporium canis*, que causa lesões na pele de pessoas e animais, agride a pele e é transmitido para outras pessoas. Para isso vamos relacionar o fungo com alguns de seus dados como idade, sexo, tipo e local da lesão.

Para sua participação você não vai fazer nenhum procedimento diferente daquele que já é realizado na rotina deste hospital para o diagnóstico da sua doença ou de seu filho. O exame consiste na raspagem da lesão da pele. Esse exame pode, às vezes, causar pequeno desconforto e, mais raramente, um pequeno sangramento. Se isso ocorrer uma compressão com gaze resolve o problema. É possível que sua lesão seja fotografada para apresentação em trabalhos ou revistas científicas, mas sua identidade será preservada.

Seu médico vai indicar o melhor tratamento após o resultado do seu exame, como já é feito no ambulatório em que você ou seu filho foi atendido. O resultado dessa pesquisa não vai mudar o tratamento que já é feito atualmente para sua doença.

Sua participação não é obrigatória, mas voluntária. Você pode se recusar a participar da pesquisa ou, a qualquer momento, desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que este fato cause qualquer constrangimento ou penalidade. Sua participação nesse estudo poderá não trazer benefícios diretos a você (ou a seu filho), mas você estará contribuindo para aumentar os conhecimentos sobre a doença que o fungo *Microsporium canis* causa,

possibilitando que no futuro melhores medidas sejam tomadas para prevenção e tratamento. Os pesquisadores se comprometem a não revelar sua identidade ou seus dados pessoais nesse estudo. Os resultados serão divulgados somente em apresentações ou publicações com fins unicamente científicos ou educativos.

Os exames e procedimentos aplicados serão totalmente gratuitos. Participar dessa pesquisa não implicará em nenhum custo para você e, como voluntário, você não receberá qualquer valor em dinheiro como compensação pela sua participação, pois essa pesquisa não irá gerar nenhum lucro financeiro para ninguém.

Antes de assinar abaixo este termo e de rubricar todas as páginas desse documento, você deve se informar plenamente sobre ele, fazendo todas as perguntas que ache necessário. Este termo encontra-se impresso em duas vias. Uma via ficará com você e a outra com os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa. A qualquer momento você poderá tirar suas dúvidas sobre esse estudo ligando para os responsáveis desse estudo nos telefones (21) 3865-9642 ou (21) 98897-0797. Você se preferir também pode enviar um e-mail para rodrigo.paes@ini.fiocruz.br para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir. Se você tiver alguma dúvida sobre algum detalhe relacionado à ética do projeto, você pode entrar em contato com o comitê de ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz, situado na Avenida Brasil, 4365 – Manguinhos, pessoalmente ou através do telefone (21) 3865-9585.

Desta forma, declaro que concordo em participar do estudo e de que fui informado de forma clara e detalhada sobre o mesmo, esclarecendo minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar, se assim eu desejar.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____.

Nome do paciente

Nome do responsável (caso o paciente seja menor de idade)

Assinatura do paciente ou responsável

Nome do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisador Responsável:

Rodrigo de Almeida Paes

Laboratório de Micologia – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas Av. Brasil,
4365 – Manguinhos Tel: (21) 3865-9642

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa que tem como título “Análise comparativa de fatores associados à virulência de isolados clínicos de *Microsporum canis* de origem humana e animal”, realizada em cooperação do Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ com a Fundação Oswaldo Cruz. O objetivo desse trabalho é estudar como o fungo *Microsporum canis*, que causa lesões na pele de pessoas e animais, agride a pele e é transmitido para outras pessoas. Para isso vamos relacionar o fungo isolado de seu cão ou gato com alguns dados do seu animal como idade, sexo, raça, tipo, gravidade e local da lesão.

Para sua participação não será feito nenhum procedimento diferente daquele que já seria realizado para o diagnóstico da doença de seu animal. O exame consiste na raspagem da lesão da pele. O animal não será sedado, somente será necessário que você segure o animal durante o procedimento. Só usaremos mordaca se o seu animal for muito agressivo. Esse exame pode, às vezes, causar pequeno desconforto e, mais raramente, um pequeno sangramento. Se isso ocorrer uma compressão com gaze resolve o problema. É possível que a lesão do seu animal seja fotografada para apresentação em trabalhos ou revistas científicas, mas sua identidade será preservada.

Se seu gato não tiver nenhuma lesão, coletaremos os pelos superficiais que se destacam mais facilmente com uma escova de dentes. As vezes o gato pode carregar o fungo nos pelos, sem apresentar doença.

Seu médico veterinário vai indicar o melhor tratamento após o resultado do exame. O resultado dessa pesquisa não vai mudar o tratamento que já é feito atualmente para a doença do seu animal, caso ele esteja doente.

Sua participação não é obrigatória, mas voluntária. Você pode se recusar a participar da pesquisa ou, a qualquer momento, desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que este fato cause qualquer constrangimento ou penalidade para você ou para seu animal. Sua participação nesse estudo poderá não trazer benefícios diretos a você (ou a seu animal),

mas você estará contribuindo para aumentar os conhecimentos sobre a doença que o fungo *Microsporium canis* causa, possibilitando que no futuro melhores medidas sejam tomadas para prevenção e tratamento. Os pesquisadores se comprometem a não revelar sua identidade ou seus dados pessoais nesse estudo. Os resultados serão divulgados somente em apresentações ou publicações com fins unicamente científicos ou educativos.

Os exames e procedimentos aplicados serão totalmente gratuitos. Participar dessa pesquisa não implicará em nenhum custo para você e, como voluntário, você não receberá qualquer valor em dinheiro como compensação pela sua participação, pois essa pesquisa não irá gerar nenhum lucro financeiro para ninguém.

Antes de assinar abaixo este termo e de rubricar todas as páginas desse documento, você deve se informar plenamente sobre ele, fazendo todas as perguntas que ache necessário. Este termo encontra-se impresso em duas vias. Uma via ficará com você e a outra com os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa. A qualquer momento você poderá tirar suas dúvidas sobre esse estudo ligando para os responsáveis desse estudo nos telefones (21) 3865-9642 ou (21) 98897-0797. Você se preferir também pode enviar um e-mail para rodrigo.paes@ini.fiocruz.br para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir.

Desta forma, declaro que concordo em participar do estudo e de que fui informado de forma clara e detalhada sobre o mesmo, esclarecendo minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar, se assim eu desejar.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____.

Nome do animal

Nome do proprietário

Assinatura do proprietário

Nome do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha