



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA NIMESULIDA ISOLADA OU EM  
ASSOCIAÇÃO COM A TERBINAFINA CONTRA FUNGOS  
DERMATÓFITOS E SEU PROVÁVEL MECANISMO DE AÇÃO *in vitro***

Rafaelle Fonseca de Matos

BELÉM – PA  
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA NIMESULIDA ISOLADA OU EM  
ASSOCIAÇÃO COM A TERBINAFINA CONTRA FUNGOS  
DERMATÓFITOS E SEU PROVÁVEL MECANISMO DE AÇÃO *in vitro***

**Autor: Rafaelle Fonseca de Matos**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Chagas Monteiro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM – PA

2015

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafaelle Fonseca de Matos

### **ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA NIMESULIDA ISOLADA OU EM ASSOCIAÇÃO COM A TERBINAFINA CONTRA FUNGOS DERMATÓFITOS E SEU PROVÁVEL MECANISMO DE AÇÃO *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

**Prof. Dra. Marta Chagas Monteiro**

Instituição: PPGCF/UFPA

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dra. Mioni Thieli Figueiredo Magalhães de Brito**

Instituição: ICS/UFPA

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Agnaldo S. Carneiro**

Instituição: ICS/UFPA

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais, Lenilson Lobato e Madalena Fonseca, por sempre permanecerem ao meu lado com seu amor incondicional. Obrigado por cada sacrificio de amor! Amo vocês ao infinito e além!

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por ser minha fonte de vida e amor, por ser o autor da minha salvação.

Aos meus pais (Lenilson e Madalena Lobato) por sempre me apoiarem em todos os meus projetos, pelo amor incondicional e sacrificial que me doam mesmo quando eu não mereço, pelo exemplo de caráter, fé e bondade com que conduzem nossa casa. Essa vitória é de vocês.

Às minhas irmãs (Adriana, Danielle e Gabriela) por sempre estarem por perto mesmo quando estão longe e atarefadas. Amo vocês irmãs.

Aos meus sobrinhos lindos Andrey, Cecília e Davi que são a alegria da nossa família!

Ao meu noivo Jonathas Paiva que me compreende e apoia em todas as horas, pelos domingos em que me acompanhou ao laboratório para experimentos que ele (Contador) sequer entendia, mas a companhia fez a diferença.

À Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro, minha orientadora, que aceitou o desafio de me conduzir, em tempo recorde, nesta etapa acadêmica com paciência, troca de conhecimento e doação de tempo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por contribuírem com conhecimento para minha formação profissional.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da UFPA que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, em especial, a Roseane Guimarães e Carla Mendonça por mostrarem o caminho das pedras.

“Quanto ao mais, irmãos, tudo o que é verdadeiro, tudo o que é honesto, tudo o que é justo, tudo o que é puro, tudo o que é amável, tudo o que é de boa fama, se há alguma virtude, e se há algum louvor, nisso pensai.

O que também aprendestes, e recebestes, e ouvistes, e vistes em mim, isso fazei; e o Deus de paz será convosco”.

Filipenses 4. 8,9.

## RESUMO

**MATOS, R.F. Atividade antifúngica da nimesulida isolada ou em associação com a terbinafina contra fungos dermatófitos e seu provável mecanismo de ação *in vitro*.** 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, 2015.

Os fungos dermatófitos tem apresentado resistência aos agentes antifúngicos atuais como a Terbinafina, e isso tem levado a estudo de novos compostos como alternativa terapêutica. Neste sentido, este estudo avaliou a ação do anti-inflamatório não esteroideal (AINE) Nimesulida isolada e combinada com a Terbinafina frente a fungos dermatófitos, a dependência de Prostaglandinas nesse mecanismo de ação e o efeito da Nimesulida na produção de urease e viabilidade fúngica. Os testes foram baseados na CLSI, clinical and laboratory standards institute – método de referência para teste de microdiluição em caldo para sensibilidade antifúngica frente a fungos filamentosos (Norma M38-A). Para os isolados clínicos das espécies *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum canis*, a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) variou na faixa >400 µg/mL - >0,112 µg/mL. Porém, os resultados mostraram que a concentração 0,002 µg/mL da Nimesulida foi capaz de inibir o crescimento de *T. mentagrophytes* ATCC 9533 e a concentração de 0,008 µg/mL foi fungicida para a mesma cepa. Os mesmos valores foram encontrados para a Terbinafina nesta cepa. A inibição do crescimento fúngico pela Nimesulida foi revertida com aplicação de Prostaglandina E2 exógena (PGE2). O teste de urease mostrou que *T. mentagrophytes* ATCC 9533 produz a enzima, porém não houve inibição da viabilidade fúngica. Já na associação Nimesulida/Terbinafina a inibição se deu na proporção 9:1, ou seja, 0,0002 µg/mL de Terbinafina e 0,0018 µg/mL de Nimesulida inibiu o crescimento fúngico porém esse resultado foi indiferente frente ao Índice de Inibição Fracionária. Nimesulida demonstrou ação antifúngica frente a dermatófitos em concentrações baixas, porém outros estudos devem ser realizados com auxílio da modelagem molecular para melhorar a especificidade do composto.

**Palavras-chave:** Dermatofitoses, Prostaglandina E2, Cicloxigenase, Urease, Nimesulida, Sinergismo.

## ABSTRACT

**MATOS, R.F. Nimesulide antifungal activity of isolated or in association with terbinafine against dermatophytes and its possible mechanism of action *in vitro*.** 2015. 78 f. Thesis (MS) - Faculty of Pharmacy, Federal University of Pará, 2015.

The dermatophytes has shown resistance to current antifungal agents such as Terbinafine, and this has led to research into new compounds as an alternative therapy. Thus, this study evaluated the action of non-steroidal antiinflammatory (NSAIDs) Nimesulide isolated and combined with Terbinafine against dermatophytes, dependence on Prostaglandins this mechanism of action and the effect of Nimesulide in the production of urease and fungal viability. The tests based were on CLSI, clinical and laboratory standards institute - reference method for microdilution test ground for antifungal susceptibility against filamentous fungi (M38-A standard). For clinical isolates of the species *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* and *Microsporum canis*, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) varied in the range > 400 ug / ml -> 0.112 g / ml. However, the results showed that the concentration of 0.002 mg / ml of Nimesulide was able to inhibit the growth of *T. mentagrophytes* ATCC 9533 and the concentration of 0.008 mg / ml was fungicidal for the same strain. Same values were find for Terbinafine on this strain. The inhibition of fungal growth by Nimesulide was reverse with application of exogenous prostaglandin E2 (PGE2). The urease test showed that *T. mentagrophytes* ATCC 9533 produces the enzyme, but no inhibition of fungal viability. In the nimesulide / Terbinafine association inhibition occurred in a ratio of 9: 1, or 0.0002 g / ml of Terbinafine and 0.0018 ug / ml of Nimesulide inhibited fungal growth but this result was the indifferent Fractional inhibition index. Nimesulide showed antifungal activity against dermatophytes in low concentrations, but other studies must be performed with the aid of molecular modeling to improve the targeting compound.

**Keywords:** Dermatophytosis, Prostaglandin E2, Cyclooxygenase, urease, Nimesulide, synergism.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação das espécies de dermatófitos segundo seu habitat natural..	10
Figura 2: A- <i>E. floccosum</i> ; B – <i>M. canis</i> ; C – <i>T. tonsurans</i> .....	11
Figura 3: Hifa hialina em espiral típica de <i>T. mentagrophytes</i> (3A); Cultura de <i>T. mentagrophytes</i> em ASD (verso – 3B) (frente – 3C).....	12
Figura 4: Típicos macroconídios em forma de charuto com microconídios granulares de <i>T. rubrum</i> .....	13
Figura 5: Macroconídios agrupados como “cachos de banana” característicos de <i>E. floccosum</i> .....	14
Figura 6: Macroconídios septados fusiformes característicos de <i>M. canis</i> .....	15
Figura 7: Esquema da entrada de dermatófitos no hospedeiro e a resposta imune do mesmo.....	17
Figura 8: A – tinea corporis; B – tinea capitis; C – Onicomicose; tinea fávica.....	18
Figura 9: Local de ação dos Inibidores da síntese do ergosterol: Azóis, Polienos e Alilaminas.....	20
Figura 10: Fórmula estrutural dos principais azóis usados no tratamento de dermatofitoses.....	21
Figura 11: Anfotericina B, principal polieno no tratamento de dermatofitose..	22
Figura 12: Fórmula estrutural da Terbinafina..	22
Figura 13: Formação de prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienos e Tromboxanos e local de ação dos AINEs. ....	26
Figura 14: Fórmula estrutural da Nimesulida.....	29
Figura 15: Estrutura química dos enantiômeros (A) R- e (B) S- do ácido 3-hidroxi - 5,8,11,14-eicosatetraenóico.....	30
Figura 16: Modelo mostrando a função da urease durante infecção fúngica pulmonar.....	32
Figura 17: Esquema de distribuição na microplaca de 96 poços.....	37
Figura 18: Mudança na estrutura química da resazurina após reação de redução ao entrar em contato com células viáveis.....	38
Figura 19: Esquema “screening” de seleção de espécies para teste de urease, PGE2 e sinergismo.....	41

Figura 20: Ensaio de microdiluição em placa com adição de resazurina para obtenção do CIM da Terbinafina e Nimesulida frente a <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533. ....	42
Figura 21: CFM pela técnica de “Pour Plate” para Terbinafina e Nimesulida frente a <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533. ....	43
Figura 22: Ensaio com resazurina para obtenção do CIM da Terbinafina e Nimesulida frente <i>T.mentagrophytes</i> isolado clínico pelo método de microdiluição em placa. ....	44
Figura 23: CFM pela técnica de “Pour Plate” para Terbinafina (CFM > 0,22 µg/mL) e Nimesulida (CFM > 400 µg/mL frente a <i>T. mentagrophytes</i> isolado clínico. ....	44
Figura 24: Ensaio de microdiluição em placa com adição de resazurina para obtenção do CIM da Terbinafina e Nimesulida frente <i>T. rubrum</i> . ....	45
Figura 25: CFM pela técnica de “Pour Plate” para Terbinafina (>0,22 µg/mL) e Nimesulida (>1,6 µg/mL) frente a <i>T. rubrum</i> . ....	45
Figura 26: Ensaio de microdiluição em placa com adição de resazurina para obtenção do CIM da Terbinafina e Nimesulida frente <i>E. floccosum</i> . ....	46
Figura 27: CFM pela técnica de “Pour Plate” para Terbinafina e Nimesulida frente a <i>E. floccosum</i> . ....	46
Figura 28: Ensaio de microdiluição em placa com adição de resazurina para obtenção do CIM da Terbinafina e Nimesulida frente <i>M. canis</i> . ....	47
Figura 29: CFM pela técnica de “Pour Plate” para Terbinafina (>0,112 µg/mL) e Nimesulida (CFM > 0,112 µg/mL) frente a <i>M. canis</i> . ....	47
Figura 30: Ação da PGE2 sobre o efeito inibitório da Nimesulida em <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533 pela Técnica de “Pour Plate” ....	49
Figura 31: Ensaio enzimático de urease mostrando a produção da enzima pelo <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533. ....	50
Figura 32: Técnica de “Pour Plate” para produção de urease em <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533: inóculo, controle positivo e controle negativo. ....	50
Figura 33: Teste de inibição da urease em tubo com Nimesulida; técnica de “Pour Plate” do tubo de urease. ....	51
Figura 34: CIM da associação Nimesulida/Terbinafina (respectivamente) na proporção 9:1; controle Negativo (Inóculo + DMSO); controle Positivo (Inóculo + Anfotericina B); Inóculo. ....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Seletividade dos principais AINEs para a COX .....	27
Tabela 2 Valores de CIM e CFM da Nimesulida frente a dermatófitos IC-isolado clínico. ....	48
Tabela 3 Resultados de FIC da Terbinafina; FIC da Nimesulida e FIX. ....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>Acetil CoA</b>	Acetil Coenzima A
<b>AINEs</b>	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
<b>ASD</b>	Ágar Sabourad Dextrose
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CFM</b>	Concentração Fungicida Mínima
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standard Institute
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>HMG CoA</b>	Hidroximetil Glutaril Coenzima A
<b>IEC</b>	Instituto Evandro Chagas
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônias
<b>FIC</b>	Concentração Inibitória Fracionária
<b>FIX</b>	Índice Inibitório Fracionário

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	10
<b>2.1 Dermatofitoses</b> .....	10
2.1.1 GÊNERO <i>Trichophyton</i> .....	12
2.1.2 GÊNERO <i>Epidermophyton</i> .....	13
2.1.3 GÊNERO <i>Microsporum</i> .....	14
<b>2.2 Aspectos Epidemiológicos</b> .....	15
<b>2.3 Patogênese</b> .....	16
<b>2.4 Agentes Antifúngicos</b> .....	19
2.4.1 AZOIS.....	20
2.4.2 POLIENOS .....	21
2.4.3 ALILAMINAS .....	22
<b>2.5 Mecanismos de Resistência Antifúngica</b> .....	24
<b>2.6 Novas Terapias Antifúngicas</b> .....	25
2.4.1 AINEs .....	26
2.4.2 NIMESULIDA .....	28
<b>2.5 Papel Da PGs Nas Infecções Fúngicas</b> .....	29
<b>2.6 Urease: enzima associada a patogenicidade nas infecções fúngicas</b> .....	31
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	34
3.1 <b>Objetivo Geral</b> .....	34
3.2 <b>Objetivos Específicos</b> .....	34
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
4.1 <b>Obtenção e manutenção da cepa testada</b> .....	35
4.2 <b>Obtenção das drogas, meios de cultura e solventes</b> .....	35
4.3. <b>Preparo do inóculo fúngico</b> .....	36
4.4 <b>Preparo das Soluções de Nimesulida e de Terbinafina</b> .....	36
4.5 <b>Determinação de CIM e CFM da Nimesulida e da Terbinafina frente a fungos dermatófitos a partir do método de microdiluição em caldo</b> .....	36
4.6 <b>Avaliação do efeito de PGE2 exógena na atividade antifúngica da Nimesulida.</b> .....	38
4.7 <b>Ensaio enzimático</b> .....	39
4.7.1 <b>DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE UREASE POR FUNGOS DERMATÓFITOS</b> .....	39

4.7.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA NIMESULIDA SOBRE A PRODUÇÃO DE UREASE EM FUNGOS DERMATÓFITOS.....	40
4.8 Teste de Sinergismo Nimesulida/Terbinafina .....	40
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Determinação de CIM e CFM da Terbinafina e da Nimesulida frente aos Dermatófitos. ....	42
5.1.1 <i>T. mentagrophytes</i> .....	42
5.1.2 <i>T. rubrum</i> .....	45
5.1.3 <i>E. floccosum</i> .....	45
5.1.4 <i>M. canis</i> .....	47
5.2 Ensaio Enzimáticos.....	48
5.2.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PGE2 EXÓGENA NA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA NIMESULIDA FRENTE A DERMATÓFITOS. ....	48
5.2.2 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE UREASE POR <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533.....	49
5.3 Determinação do CIM a partir do sinergismo entre Nimesulida associada a Terbinafina frente ao <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533.....	51
6 DISCUSSÃO .....	53
7 CONCLUSÕES .....	58
8 REFERÊNCIAS.....	59

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas superficiais ou cutâneas, chamadas dermatofitoses, acometem cerca de 20-25% da população mundial (AMEEN, 2010), sendo considerada a terceira maior causa de infecções em crianças menores de 12 anos e a segunda em adultos (RODRIGUES et al. 2012). As dermatofitoses são causadas por fungos que se alimentam da queratina presente na pele, cabelo ou unhas, e as principais espécies são: *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* e *Epidermophyton floccosum* (NASERI et al. 2013 e LAKSHMIPATHY et al. 2010). De acordo com o habitat natural, esses patógenos podem ser classificados em: geofílicos (solo), zoofílicos (animais) ou antropofílicos (homem). As dermatofitoses não são consideradas doenças oportunistas, no entanto, em alguns casos, indivíduos imunocomprometidos podem apresentar disseminação destes fungos através de camadas mais profundas da pele e causar infecções invasivas (RODRIGUES et al. 2012).

Como as dermatofitoses residem no estrato córneo mais especificamente nos queratinócitos, o tratamento se baseia na capacidade do agente antifúngico em penetrar e se manter nestes sítios (LAKSHMIPATHY et al. 2010). Nesse sentido, três grandes grupos de fármacos são importantes no tratamento das dermatofitoses: os azóis, os polienos e as alilaminas. Os Azóis que agem interferindo na fase final da síntese do ergosterol e estão divididos em imidazóis (Miconazol, Clotrimazol, Cetoconazol e Bifonazol) e triazóis (Fluconazol, Voriconazol, Itraconazol e Terconazol) de acordo com o número de nitrogênios na molécula. O Grupo dos Polienos, como a anfotericina B que formam complexo com o ergosterol na membrana plasmática fúngica comprometendo assim sua função de barreira e o Grupo das alilaminas, como a terbinafina e a naftifina, que agem inibindo a síntese do ergosterol numa fase inicial do processo (GEORGOPAPADAKOU, 1998; ZHANG et al. 2007; LAKSHMIPATHY et al. 2010).

A terbinafina, foi sintetizada na década de 80 a partir da naftalina e tem se mostrado um excelente agente contra fungos dermatófitos. Seu principal mecanismo de ação é a inibição da esqualeno epoxidase, uma enzima essencial na síntese do ergosterol presente na membrana celular fúngica (ZHANG et al. 2007). Por ser uma substância bastante lipofílica a Terbinafina é bem absorvida e se deposita nos

tecidos amplamente com um volume de distribuição de cerca de 20L/kg (RASHID, 1995). Isso exige que uma dose bastante elevada (cerca de 250mg/dia) seja administrada em relação a Concentração Inibitória Mínima (CIM) encontrada *in vitro* (0.6 – 2,1  $\mu$ M) (LEYDEN, 1998). Apesar de ocasionar poucos efeitos adversos, como urticária, distúrbios gastrointestinais, dor abdominal e outros, o longo tempo de tratamento (cerca de 6 – 12 semanas) leva a descontinuação do tratamento pelo paciente (ZHANG et al. 2007).

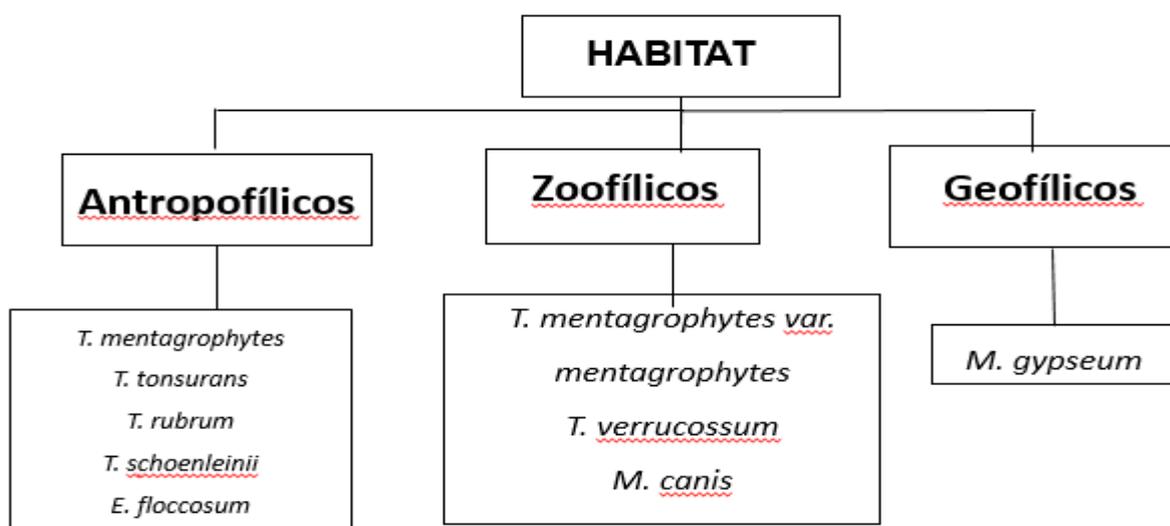
Com isso, há intensa busca de novas possibilidades terapêuticas contra fungos dermatófitos que permitam diminuir o tempo e a toxicidade do tratamento crônico. Nesse contexto, anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) têm sido estudados amplamente, visto que várias investigações relatam seu efeito antifúngico *in vitro e in vivo* (AL-KURAI SHY, 2013; AVRAM et al. 2009; AL-JANABI, 2011; QUADROS et al. 2011). Os AINES são inibidores da enzima cicloxigenase (COX) que podem agir na COX-1, constitutiva, ou na COX – 2 que é induzida, estas enzimas por converter o ácido araquidônico em prostaglandinas (PGs), prostaciclina e tromboxanos. Na infecção fúngica, tanto as células do hospedeiro como o patógeno podem ser fontes de PGs, moléculas lipídicas envolvidas na modulação da resposta imune do hospedeiro (NOVERR et al. 2001). Quadros (2011) mostrou que os AINES, como a aspirina e indometacina foram capazes de inibir o crescimento de *Candida albicans* em concentrações micromolares, e a este efeito foi revertido pela PGE2 exógena. Desta forma, este estudo investigou o efeito antifúngico da Nimesulida e Terbinafina, e de sua associação, frente aos fungos dermatófitos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Dermatofitoses

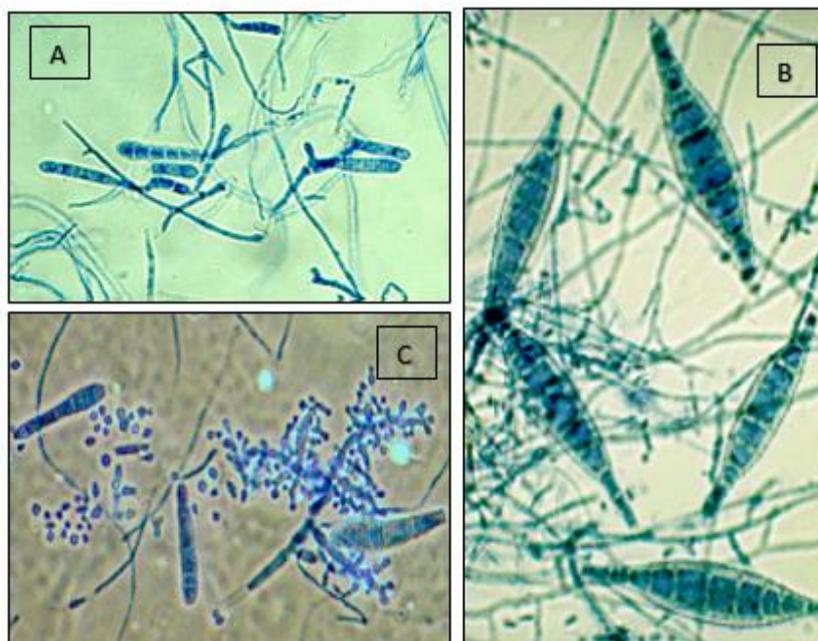
Dermatofitoses são infecções fúngicas superficiais que afetam especificamente o estrato córneo da pele e anexos podendo acometer superfícies de mucosas humanas ou de animais. Essas infecções são geralmente chamadas de *tineas*, devido as características das lesões e o local em que elas ocorrem (*tinea pedis*, *tinea capitis*, *tinea corpore*, *tinea barbae*). As onicomicoses (micoses de unhas) são os tipos mais comuns de dermatofitoses em humanos (ZHANG et al. 2007). Por afetar particularmente tecidos queratinizados tem se tornado alvo de grande preocupação, em virtude da elevada ocorrência em todo o mundo. É uma infecção cosmopolita onde a localização geográfica, os fatores ambientais e de crescimento contribuem para uma maior incidência dessas infecções em regiões de clima tropical ou subtropical e em países em desenvolvimento (DIEGO, 2010; LAKSHMIPATHY et al. 2010).

Os responsáveis por causar dermatofitoses são fungos filamentosos classificados de acordo com seu habitat natural em zoofílicos, antropofílicos ou geofílicos (Figura 1).



**Figura 1:** Classificação das espécies de dermatófitos segundo seu habitat natural. Fonte: esquema do autor, baseado em "Dermatophyte e host relationship of a murine model of experimental invasive dermatophytosis" (2012).

Os dermatófitos incluem três gêneros: *Trichophyton*, *Epidermophyton*, e *Microsporum*, pertencentes à classe *Hyphomycetes* e família *Moniliaceae* (Figura 2) (TRABULSI, L.R e ALTERTHUM, F, 2008).



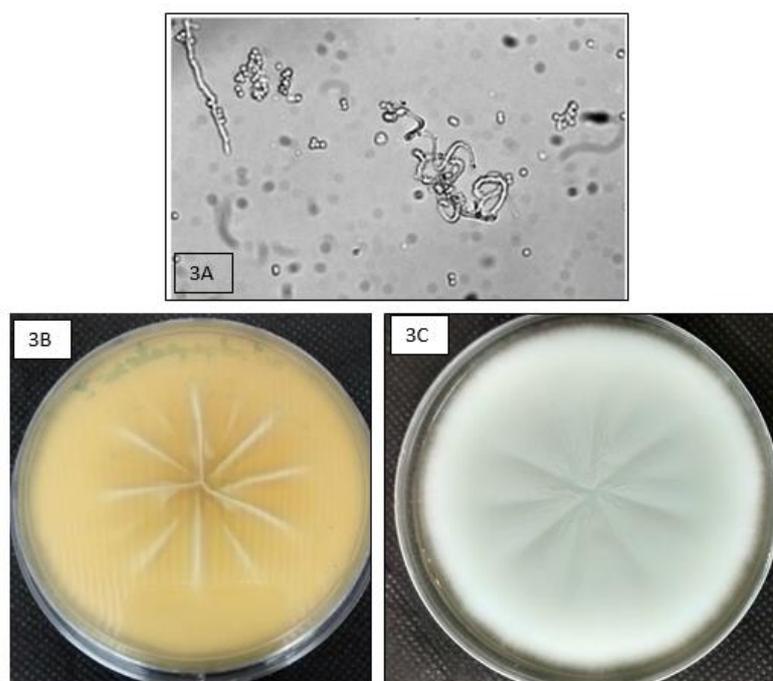
**Figura 2:** A- *E. floccosum*; B – *M. canis*; C – *T. tonsurans*. Fonte: [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Dermatophytes](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Dermatophytes). Acesso em 04/04/2015

Esses gêneros incluem cerca de 30 espécies sendo as mais importantes: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Epidermophyton floccosum* (CAFARCHIA et al. 2013). Sua identificação é baseada predominantemente sobre a morfologia dos conídios e conidióforos, podendo ser feita com solução de Hidróxido de potássio 10% colocado sobre um corte da cultura ou de tecidos como pele, cabelo, unha acrescentado de tinta como o azul de metileno para melhor visualização (LARONE, 1996). Estudos mostram que a identificação de espécies de dermatófitos pode ser realizada pela análise de DNA ribossomal ou DNA mitocondrial, como mostrado por Kambe e colaboradores (2003) que usaram misturas de primers específicos para o gene DNA topoisomerase II na identificação de espécies de dermatófitos. Neste estudo, os autores demonstraram que o *T.*

*rubrum*, *M. canis*, *M. gypseum* e *E. floccosum* podem ser identificados pelo tamanho original do produto do DNA de cada espécie, porém não o *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans*. Mais recentemente, estudos usando espectrometria de massa MALDI-TOF tem sido utilizado para identificação e classificação de muitos micro-organismos e ensaios com fungos já foram iniciados (CHALUPOVĀ et al. 2014).

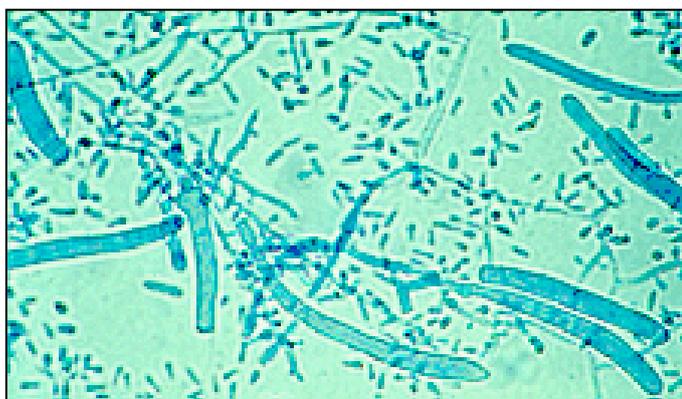
### 2.1.1 GÊNERO *Trichophyton*

O fungo filamentososo do gênero *Trichophyton* foi descoberto em 1845 por Malmsten e em 1847 a espécie *T. mentagrophytes* foi identificada por Charler Robin (MARQUES, 2000). Microscopicamente, observam-se hifas hialinas em espiral como sendo a principal característica do *T. mentagrophytes* (Figura 3A), já as colônias em ágar, apresentam-se aveludadas com macroconídios de parede fina e com superfície lisa (Figura 3B e 3C). Este usa o aminoácido metionina como fonte de azoto (LAKSHMIPATHY et al. 2010).



**Figura 3:** Hifa hialina em espiral típica de *T. mentagrophytes* (3A); Cultura de *T. mentagrophytes* em ASD (verso – 3B) (frente – 3C). Fonte: Lange et al, 2009.

A espécie *T. rubrum* só foi descrita em 1910 por Castellani sendo conhecida como o agente etiológico de *tinea pedis* e onicomicoses que são as micoses de unha (KUIJPERS et al. 2000; RIPPON, 1988). É o principal agente de dermatofitoses crônica e de onicomicoses apresentando resistência a muitas terapias antifúngicas (FERNÁNDEZ-TORRES et al. 1998; AMEEN, 2010). Microscopicamente, observa-se macroconídios em forma de charuto com microconídios granulares abundantes (Figura 4).



**Figura 4:** Típicos macroconídios em forma de charuto com microconídios granulares de *T. rubrum*.  
Fonte: [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions). Acesso em 04/04/2015

### 2.1.2 GÊNERO *Epidermophyton*

O principal representante é o *E. floccosum* conhecido por invadir pele e unhas, porém não cabelos. Foi descrito primeiramente em 1980 por Harz que o nomeou originalmente como *Acrotheciun floccosum*. Microscopicamente, apresenta macroconídios em forma claviforme, de paredes finas com extremidade arredondada composto por 2-5 células, medem de 20-40  $\mu\text{m}$  de comprimento por 6-7 $\mu\text{m}$  de largura, podendo ocorrer em grupos arranjados semelhante a “cachos de banana” (Figura 5). Não há microconídios, mas uma abundância de clamidiosporos podem ser encontrados em culturas de duas semanas ou mais (McCOEMAC et al. 1952).



**Figura 5:** Macroconídios agrupados como “cachos de banana” característicos de *E. floccosum*. [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions). Acesso em 04/04/2015.

### 2.1.3 GÊNERO *Microsporum*

A espécie *M. canis* tem caráter zoofílico quanto ao seu habitat natural sendo cães e gatos seus hospedeiros naturais (ALY RAZA, 1994). É o principal causador de *tinea capitis*, uma infecção caracterizada por coceira intensa no couro cabeludo, pápulas escamosas vermelhas no fio do cabelo fazendo-os romper (MAO et al, 2014). Microscopicamente, observa-se a presença abundante de macroconídios fusiformes de paredes espessas divididos por septos de espessura variável (Figura 6) (MARPLES, 1956).



**Figura 6:** Macroconídios septados fusiformes característicos de *M. canis*. [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions). Acesso em 04/04/2015

## 2.2 Aspectos Epidemiológicos

Estima-se que cerca de 20% a 25% da população mundial esteja acometida por dermatofitoses, devido à imigração, aumento do turismo e troca nas condições socioeconômicas, fatores que tem levado a aumento progressivo desta patologia nos últimos anos. Um exemplo do resultado da imigração é que as dermatofitoses endêmicas na Ásia e África têm sido encontradas com frequência na Europa e na América do Norte (AMEEN, 2010). As dermatofitoses ocupam o terceiro lugar em infecções da pele em crianças menores que 12 anos e o segundo lugar em adultos, sendo que cerca de 59,6% destas infecções ocorrem nos homens em relação a 40,4% nas mulheres. Estudo realizado no Iran relatou que a *Tinea corporis* é a infecção fúngica mais comum seguida pela *tinea capitis*, *tinea manuum*, *tinea cruris*, *tinea unguium* e *tinea barbae*, corroborando com outros estudos com esses mesmos achados (NASSERI, 2013; RODRIGUES et al. 2012).

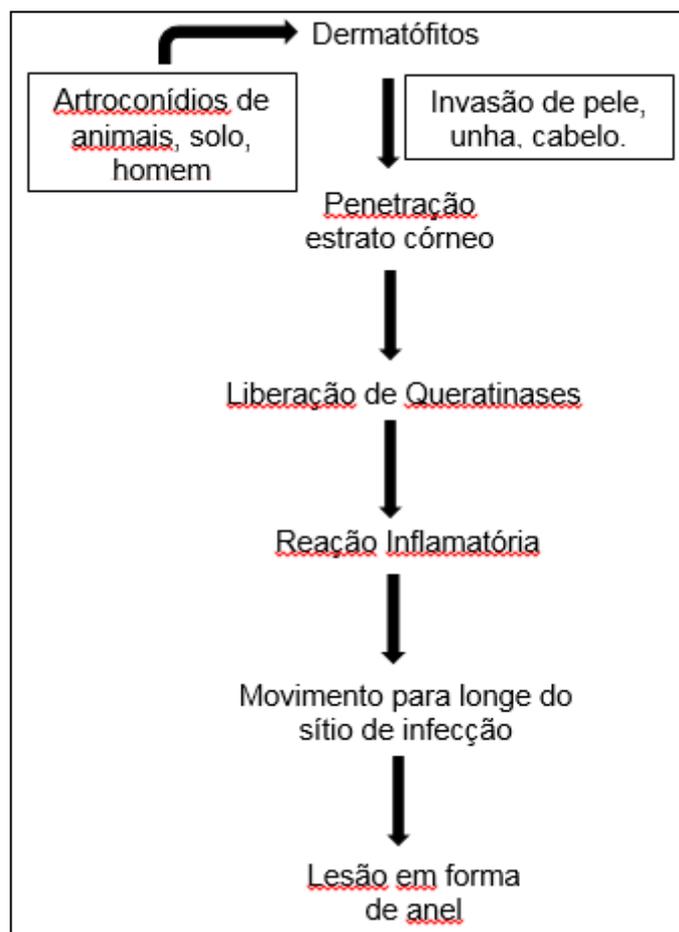
No Brasil, Siqueira e colaboradores (2006) e Brilhante e colaboradores (2000) mostraram que a prevalência de dermatofitoses entre lesões cutâneas em estudantes universitários varia de 18,2 a 23, 2%. Estudo feito na cidade de Fortaleza

(Ceará- Brasil) mostrou que mulheres (61,4%) são mais acometidas por dermatofitoses que os homens (38,6%), principalmente na faixa etária de 51-60 anos. Dentre as dermatofitoses encontradas, a mais incidente foi a onicomicoses (38,6%), seguida por *tinea corporis* (24,1%) e *tinea capitis* (22,1%) (PIRES et al. 2014). Também se observa uma alta incidência (64,7%) de dermatofitoses na região amazônica principalmente devido às suas características ambientais como clima quente e úmido (OLIVEIRA et al. 2006).

A infecção requer o contato interpessoal ou com fômites e animais contaminados, por meio de propágulos, sendo mais fácil a sua transmissão nas comunidades, lugares recreativos e nas famílias (SEEBACHER et al., 2008). Na investigação clínica e na rotina laboratorial, esses fungos assumem caráter relevante quando correlacionados aos agravos à saúde da população, como micoses superficiais, cutâneas, oportunistas e sistêmicas (HARVEY et al., 2008).

### **2.3 Patogênese**

As dermatofitoses são geralmente superficiais, porém, podem causar doença disseminada e severa em pessoas imunocomprometidas (NASSERI, 2013). As hifas desses organismos micelares penetram o estrato córneo da pele e anexos e fabricam proteases queratolíticas responsáveis pela penetração nas células e induzindo reação inflamatória no sítio da infecção. Essa reação inflamatória faz com que o patógeno se mova para longe do sítio da infecção e se estabeleça em novo local. Esse movimento do patógeno faz com que lesões clássicas em forma de anel sejam produzidas (Figura 7).



**Figura 7:** Esquema da entrada de dermatófitos no hospedeiro e a resposta imune do mesmo. Fonte: Adaptado de Lakshmipathy et al (2010).

Esses fungos são saprófitas em geral, digerindo queratina para sua sobrevivência. Sua classificação se dá de acordo com o local de infecção podendo afetar unha, cabelo e pele (Figura 8) principalmente causando processo inflamatório local com descamação e até perda de tecido (DAHL, 1994; ELEWSKY, 1998; LAKSHMIPATHY E KANNABIRAN, 2010).



**Figura 8:** A – tinea corporis; B – tinea capitis; C – Onicomicose; tinea fávica. Fonte: [http://www.fungalguide.ca/basics/images/fungal\\_5.html](http://www.fungalguide.ca/basics/images/fungal_5.html). Acesso em 25/04/2015

O processo de invasão se dá pela quebra das pontes dissulfetos da rede proteica que compõem os tecidos queratinizados. Essa degradação proteica é semelhante a que ocorre em *Aspergillus sp* e irá gerar aminoácidos fonte de componentes essenciais para a sobrevivência fúngica (URIBE et al. 2013). Por essa razão, a secreção de várias enzimas pelos dermatófitos, como proteases, lipases, elastases, collagenases, fosfatases e esterases, são importantes fatores de virulência expressos durante o processo infeccioso, que podem auxiliar na degradação dos componentes proteicos e lipídicos da pele, facilitando o processo de penetração no estrato córneo. A indução dessas proteases pode contribuir para o potencial desses fungos em degradar componentes das camadas mais profundas, tais como a elastina da derme, em indivíduos imunocomprometidos (TEIXERA et al. 2010).

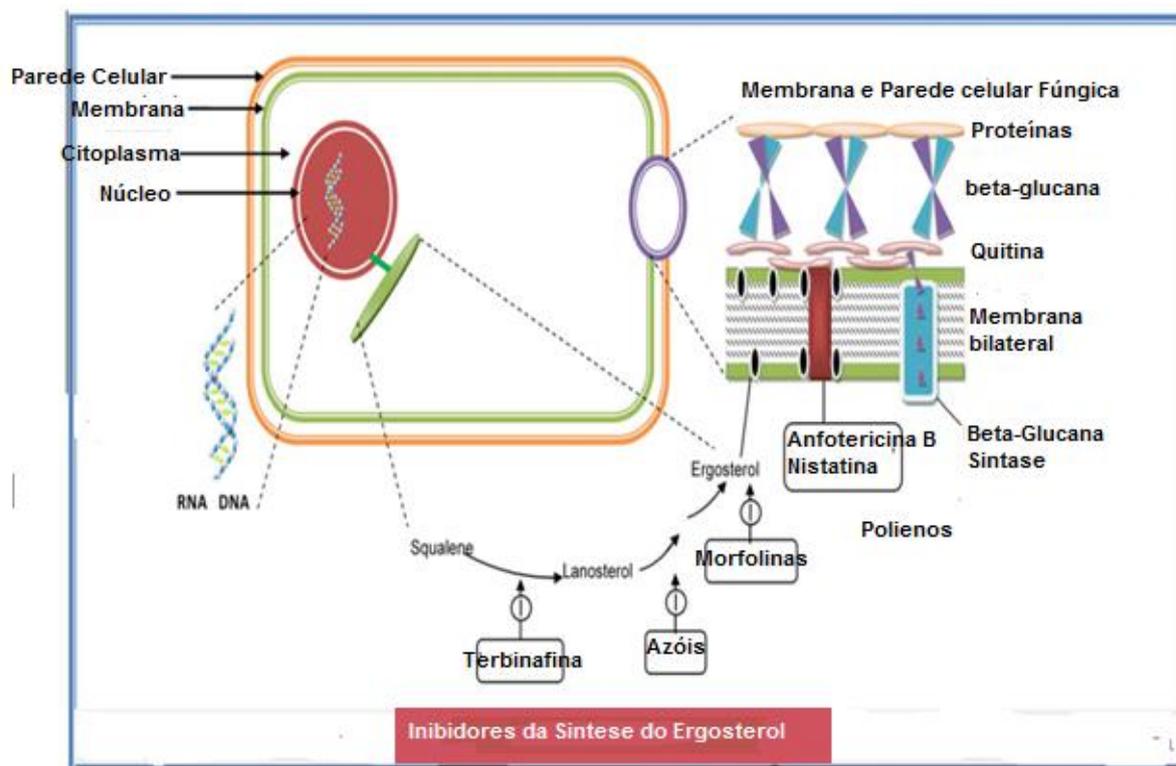
Os mecanismos imunológicos de defesa contra infecções fúngicas abrangem tanto a resposta imune inata como a resposta imune adaptativa, principalmente a resposta mediada por células que é o mais importante mecanismo de defesa do hospedeiro ao fungo. Na dermatofitose, a resposta celular produz um estado imunoprotetor contra reinfecção e a resolução da doença que está relacionada com

uma resposta de hipersensibilidade retardada, por isso vacinas de uso veterinário são usadas levando a este tipo de reposta imune (BLANCO e GARCIA, 2008).

Além disso, vários estudos mostram que quanto maior a capacidade queratolítica dos dermatófitos maior será a virulência atribuída (MARANHÃO et al. 2007; MENDEZ-TOVAR, 2010). Desta forma, a virulência fúngica é resultado da interação entre o micro-organismo infectante e a resposta imune do hospedeiro. Sendo que, durante a infecção, a resposta imune celular é a principal responsável por proteger o hospedeiro da infecção fúngica. No entanto, o fungo pode ativar linfócitos T-supressores e T auxiliares que levam a inativação dos mecanismos celulares do hospedeiro (ACHTERMAN E WHITE, 2012). Assim, é necessário a investigação de fármacos cada vez mais específicos aos fungos e menos tóxicos (TEIXERA et al. 2010).

## **2.4 Agentes Antifúngicos**

O tratamento das dermatofitoses é escolhido segundo o sítio de infecção, o agente etiológico e a habilidade de penetração da droga. Como a infecção se localiza no estrato córneo, a habilidade de penetração nos queratinócitos é muito importante para a escolha da droga (GHANNOUM e RICE, 1999). Desde o uso de ácido salicílico, ácido benzoico, nitrato de prata e tintura de iodo, o tratamento das dermatofitoses evoluiu buscando maior eficácia e menor efeito adverso para o hospedeiro (LAKSHMIPATHY et al. 2010). Hoje, as principais classes de drogas antifúngicas usadas são: os Azóis, os Polienos e as Alilaminas, todas agindo nas vias de síntese do ergosterol (Figura 9) (TSITSIGIANNIS et al. 2005).

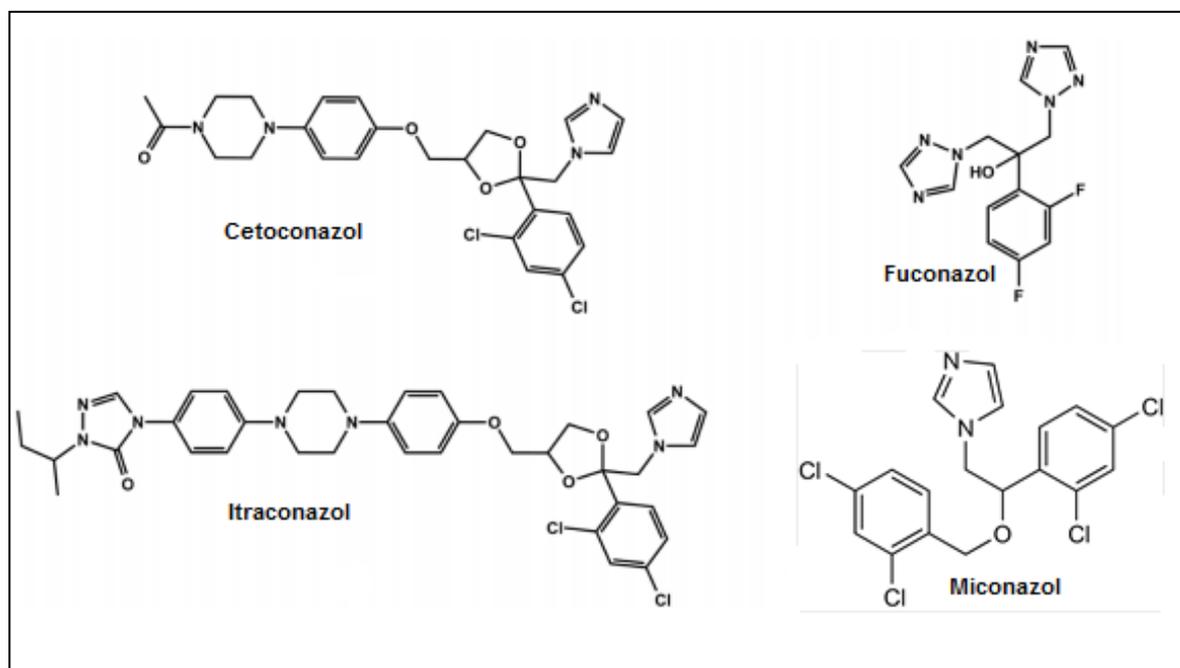


**Figura 9:** Local de ação dos Inibidores da síntese do ergosterol: Azóis, Polienos e Alilaminas. Fonte: Adaptado de Kathiravan et al. (2012).

#### 2.4.1 AZOIS

Em 1970, foi lançado o primeiro membro do grupo dos azóis, o Miconazol. Em seguida, várias outras drogas foram incluídas nessa classe (Figura 10) gerando outros dois subgrupos classificados de acordo com o número de átomos de nitrogênio: os imidazóis (miconazol, clotrimazol, cetoconazol, tioconazol, oxiconazole) e os triazóis (fluconazol, voriconazol, itraconazol) (ODDS et al. 2003; LAKSHMIPATHY et al. 2010). Os azóis se caracterizam por drogas fungistáticas que inibem 14 $\alpha$ -desmetilação do lanosterol na via biossintética do ergosterol. Com o ergosterol empobrecido e substituído por esteróis incomuns, a permeabilidade normal e fluidez da membrana fúngica é alterada, com consequências secundárias para as enzimas ligadas a membranas, tais como as envolvidas na síntese da parede celular (LASS-FLÖRL, 2011). A resistência aos azóis pode ocorrer por mutações que na molécula-alvo ou por expressão diminuída de bombas de efluxo de

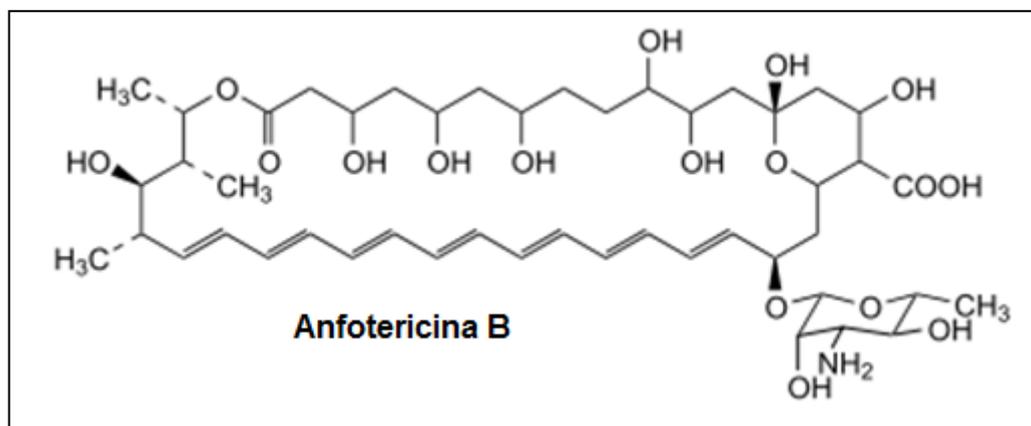
membrana que exportam os antifúngicos a partir da célula (LUPETTI et al. 2002; LÉCHENNE et al. 2007).



**Figura 10:** Fórmula estrutural dos principais azóis usados no tratamento de dermatofitoses. Fonte: adaptado de Lupetti et al. (2012).

#### 2.4.2 POLIENOS

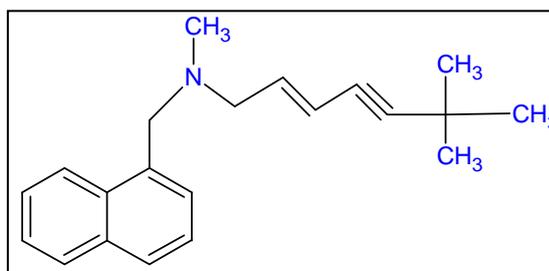
Esta classe de fármacos antifúngicos foi desenvolvida no final dos anos 50 a partir da fermentação de espécies de *Streptomyces* tendo como principais representantes a Anfotericina B (Figura 11) e a Nistatina. A ação desses se dá pela formação de complexo com o ergosterol da membrana do fungo formando uma lacuna entre os componentes da membrana celular o que leva a morte da célula fúngica (ZHANG et al. 2007). Também pode ocorrer dano oxidativo, fato que contribui para sua ação fungicida (LUPETTI et al. 2002). A Anfotericina B possui uma maior afinidade pelo ergosterol do que pelo colesterol sendo, portanto, menos tóxica para células de mamíferos, mas podendo causar nefrotoxicidade quando usada cronicamente (GEORGOPAPADAKOU, 1998).



**Figura 11:** Anfotericina B, principal polieno no tratamento de dermatofitose. Fonte: adaptado de Lupetti et al. (2012).

#### 2.4.3 ALILAMINAS

Caracterizadas como inibidores da esqualeno epoxidase, as alilaminas inibem a síntese do ergosterol fúngico numa etapa inicial do processo. Ao inibir a enzima esqualeno epoxidase, responsável em converter esqualeno a 2,3 – oxidoesqualeno (precursor do ergosterol), níveis tóxicos de esqualeno são acumulados no interior da célula fúngica e com a diminuição de ergosterol a parede celular fúngica é então enfraquecida. A Terbinafina (Figura 12) é o fármaco mais importante desta classe, que tem tanto propriedades fungistática quanto fungicida (NOVERR, 2001; KELLER, 2012).



**Figura 12:** Fórmula estrutural da Terbinafina. Fonte: Próprio autor adaptado de Leyden (1998).

A terbinafina é bem absorvida por via oral (cerca de 70%), apresentando concentração plasmática máxima (0.8 a 1.5 µg/mL) 2h após administração única. Por tratar-se de um fármaco lipofílico se concentra rapidamente no estrato córneo primeiramente por difusão do sistema vascular com aumento da concentração no sebo, cabelo e unha (LEYDEN, 1998). Após um tratamento por 30 dias com 250mg/dia de Terbinafina, níveis da droga nos cabelos e unhas ainda podem ser encontrados mesmo 90 dias após o fim do tratamento (KELLER, 2012).

A terbinafina é metabolizada no fígado independente da via P450 originando metabólitos tais como carboxiterbinafina, hidroxiterbinafina, desmetil e n-desmetilterbinafina (LEYDEN, 1998). A incidência relativamente baixa de efeitos adversos observados se mostra como uma vantagem do uso de terbinafina frente aos outros fármacos. Os efeitos adversos mais comuns são sintomas gastrointestinais, prurido, alterações nos testes de função hepática todos estes cessam com a interrupção do tratamento (ZHANG et al. 2007). Esses eventos adversos foram considerados ligeiros ou moderados e incluem: queixa gastrointestinal (náuseas, dor abdominal, vômitos, diarreia), erupções cutâneas, aumento de peso, alterações do apetite, dores de cabeça, e vertigem (NEWLAND e ABDEL-RAHMAN, 2009). No entanto, estudos comprovam que a Terbinafina pode produzir dano hepático, por isso não é recomendada aos pacientes com doença hepática pré-estabelecida (GRUPTA e RYDER, 2003). Por se tratar de um potente inibidor da isoenzima 2D6 do citocromo P 450 (CYP2D6) pode afetar o perfil farmacocinético de outros fármacos que são substratos para esta enzima. Além disso, a terbinafina sofre extenso metabolismo hepático de primeira passagem e ampla eliminação por excreção renal (cerca de 80%), com isso seu uso por pacientes com doença renal crônica deve ser criterioso (DARKES et al. 2003).

Devido ao uso prolongado da terbinafina em várias situações clínicas, há alguns relatos de cepas de dermatófitos resistentes à terbinafina nos últimos anos, no entanto, estas cepas ainda são raras (FAVRE et al. 2001; LEIDICH et al. 2001; LUPETTI et al. 2002; OSBORNE et al. 2003, 2005,2006; GHELARDI et al. 2014).

## 2.5 Mecanismos de Resistência Antifúngica

Os principais mecanismos de resistência aos agentes antifúngicos estão relacionados com suas características intrínsecas ou adquiridas do patógeno (PFALLER, 2012). Para Lupetti e colaboradores (2002), a resistência aos azóis é o problema clínico mais relevante, cujos principais mecanismos levam a redução intracelular do acúmulo de azóis, devido aos baixos níveis de ergosterol ou pelo aumento dos níveis de bombas de efluxo que transportam o fármaco para o meio extracelular, tais mecanismos podem se apresentar combinados no fungo. Hamilton-Miller (1973), propôs que essa resistência surge devido a alterações qualitativas ou quantitativas nos níveis de ergosterol da célula.

Nesse sentido, Vanden Bossche e colaboradores (1992), demonstraram a resistência cruzada de Fluconazol e Terbinafina em *Candida glabrata*, resultado similar encontrado por Pfaller (2012). Em 2005, Osborne e colaboradores identificaram isolados clínicos de *T. rubrum* resistentes a Terbinafina, resistência que estava associada a uma substituição de aminoácido na enzima esqualeno epoxidase nestes mutantes resistentes ao fármaco. Esta mesma substituição de um aminoácido foi relatada em cepas de *C. albicans*, com isso estes autores sugeriram que este resíduo faz parte do sítio de ligação da alilamina na enzima. Essa hipótese também foi sustentada por Ghelardi e colaboradores (2014), que analisaram o potencial de resistência cruzada de inibidores da esqualeno epoxidase frente a *T. rubrum* e mostraram o surgimento espontâneo de cepas mutantes de *T. rubrum* resistentes à Anfotericina, Terbinafina e Itraconazol, embora em baixa frequência, e que as concentrações sub-inibitórias das drogas facilitam o aparecimento de cepas resistentes. Diante disto, novas terapias antifúngicas com diferentes mecanismos de ação dos fármacos já conhecidos são necessárias.

Um dos novos agentes antifúngicos inseridos recentemente na clínica médica é o Ciclopirox (6- ciclo-hexil-1-hidroxi-4-metil-2 (1H) -piridona), que é uma hidroxipiridona sintética de largo espectro que difere em estrutura e mecanismo dos outros agentes antifúngicos. Sua atividade antifúngica e antibacteriana é atribuída ao grupo hidroxipiridona já que a perda completa dos grupos hidroxi-substituintes influencia na sua atividade antifúngica (GUPTA e BARAN, 2000). O mecanismo de

ação do Ciclopirox é principalmente devido a elevada afinidade deste composto por cátions trivalentes, como  $Fe^{3+}$  que são cofatores essenciais para enzimas, como citocromos. Esta inibição enzimática pelo Ciclopirox por afetar os processos de transporte de elétrons mitocondriais importantes da produção de energia, prejudicando assim o metabolismo microbiano. Além disso, este fármaco pode inibir fortemente a atividade de catalase e peroxidase, que são responsáveis pela degradação intracelular de peróxidos tóxicos (BOHN e KRAEMER, 2000). Na clínica, o Ciclopirox é usado topicamente e pode ser combinado com a Terbinafina em uso oral, tal terapia mostra um bom resultado nas infecções fúngicas (GUPTA, 2005).

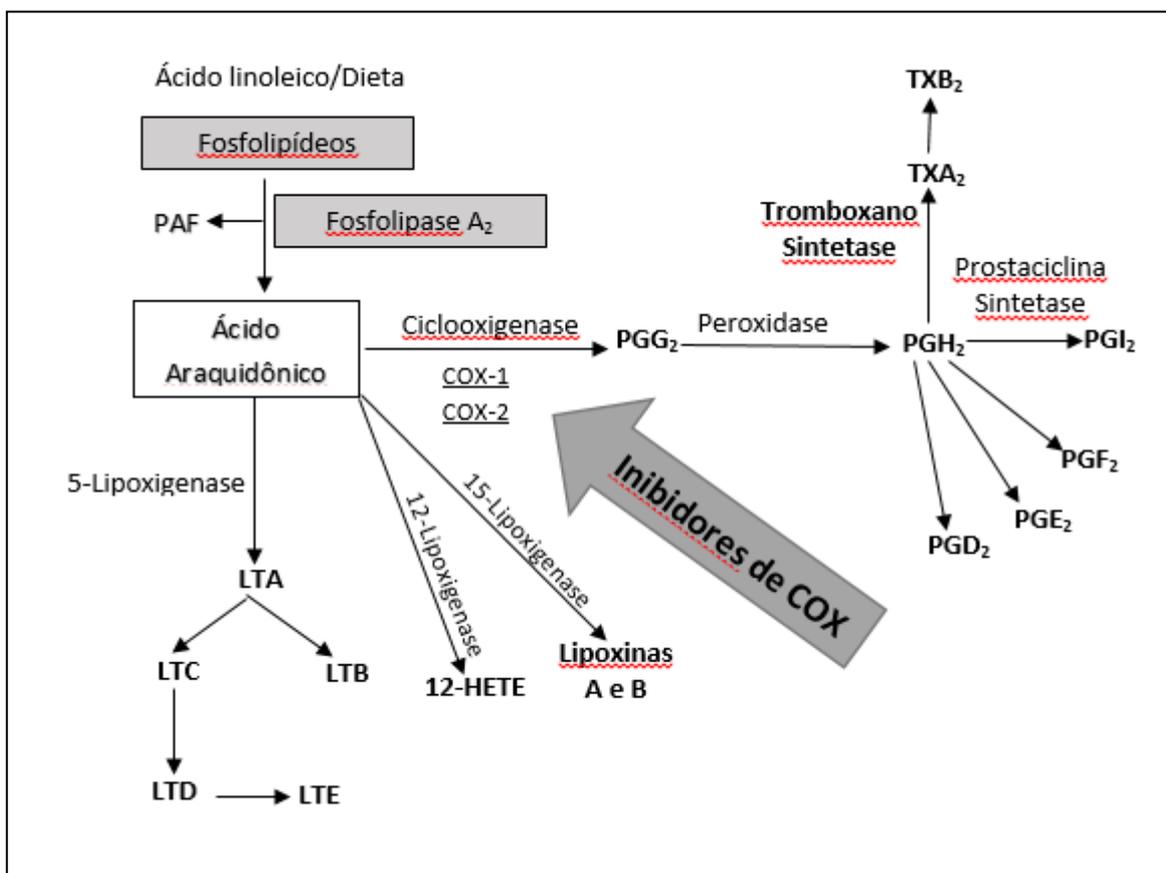
## 2.6 Novas Terapias Antifúngicas

Antifúngicos orais como a Anfotericina B, o Itraconazol e a Terbinafina são frequentemente utilizados para o tratamento da dermatofitose, principalmente a onicomicose (ZHANG et al. 2007). No entanto, a toxicidade destas drogas, o surgimento de cepas resistentes, o longo tratamento e a baixa eficácia têm limitado a sua utilização clínica (KHATIVARAN et al. 2012). Desta forma, nas últimas duas décadas, novos agentes antifúngicos com melhor absorção e eficácia tem sido aprovado por agências reguladoras internacionais, tais como o voriconazol, caspofugina e formulações lipídicas de Anfotericina B (ZHANG et al. 2007). Com isso, a indústria farmacêutica tem investido constantemente em novos potenciais alvos farmacológicos com elevada atividade antifúngica.

Nesse sentido, durante a infecção fúngica tanto as células do hospedeiro como o patógeno são fontes de PGs, moléculas lipídicas envolvidas na modulação da resposta imune do hospedeiro (NOVERR et al. 2001). Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são exemplos de fármacos que agem inibindo a síntese de PGs e que mostraram efeito antifúngico contra *C. albicans*, *A. fumigatus* e fungos dermatófitos como *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e outros em estudos anteriores (CHOWDHURY et al. 2003; ALEM et al. 2004; QUADROS et al. 2011; AL-JANABI, 2009, 2011). Sendo assim, estes fármacos se tornaram potenciais terapêuticos contra vários micro-organismo, principalmente fungos.

### 2.4.1 AINEs

Os AINEs são amplamente utilizados no tratamento da dor, inflamação e edema, bem como em doenças como artrite reumatoide, osteoartrite e distúrbios músculo esqueléticos (HOWARD, 2004). Ácidos orgânicos fracos atuam principalmente nos tecidos inflamados ligando-se significativamente à albumina plasmática (BRENOL *et al.*, 2000). Seu mecanismo de ação se dá pela inibição da enzima COX responsável por converter o ácido araquidônico em Prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). A PGH<sub>2</sub> é então metabolizada por outras enzimas para formar várias PGs, Prostaciclina e tromboxanos, conforme figura 13 (VANE, 1971; MITCHELL *et al.* 1994). Esta enzima pode ser expressa tanto constitutivamente (COX-1) quanto de forma induzida durante o processo inflamatório (COX-2) (MITCHELL, 1994; ANTMAN *et al.* 2007).



**Figura 13:** Formação de prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienos e Tromboxanos e local de ação dos AINEs. Fonte: Adaptado de [http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id\\_materia=3744](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=3744)

Fisiologicamente, a isoforma COX-1 (constitutiva) auxilia na manutenção da integridade da mucosa gastroduodenal, hemostasia vascular, modulação do fluxo plasmático renal e agregação plaquetária (KLIPPEL et al. 2001). A COX-2 é geralmente indetectável na maioria dos tecidos apesar de estar presente nos rins, cérebro, ossos e também sistema reprodutor feminino, porém tem sua expressão aumentada durante processos inflamatórios (NAKANO et al. 2007; SOLOMON, 2007).

Tanto a COX-1 quanto COX-2 apresentam cerca de 60% de homologia no domínio catalítico, possuem a mesma afinidade e capacidade de converter ácido araquidônico em PGH<sub>2</sub> (ANTMAN et al. 2007). Sendo assim, ambas isoformas podem ser inibidas de forma não seletiva pelos AINEs considerados tradicionais, tais como Aspirina (ácido acetil salicílico), Ibuprofeno e Diclofenaco, o que leva a efeitos colaterais provocados principalmente pela inibição da COX-1. Nesse sentido, AINEs com maior seletividade à COX-2 têm sido desenvolvidos e são usados com maior frequência como por exemplo a Nimesulida, os Oxicans (Meloxicam e Piroxicam) e os Coxibes (Celecoxibe e Rofecoxibe) (SULEYMAN et al. 2008; FELDMAN, 2007). A seletividade dos principais AINEs está resumida na Tabela 1.

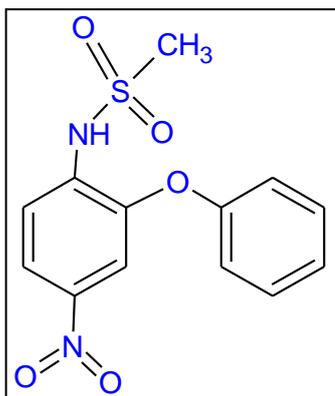
Tabela 1 Seletividade dos principais AINEs para a COX (adaptado de CHAHADE et al., 2008).

AINES	MECANISMO DE AÇÃO
Aspirina	Inibidor seletivo da COX-1 (baixa dose) e inibidor não seletivo da COX-1 (alta dose)
Diclofenaco/Ibuprofeno	Inibidor não seletivo da COX
Nimesulida/Meloxicam/Piroxicam	Inibidor seletivo da COX-2
Celecoxibe/Rofecoxibe	Inibidor altamente seletivo da COX-2

## 2.4.2 NIMESULIDA

Em 1985, a Nimesulida foi descoberta na Itália, com propriedades analgésica, anti-inflamatória e antipirética (Fig. 14) e uma década depois foi descrita como inibidor com maior seletividade para COX-2 (BURKE et al. 2006). É o único composto não-experimental de uma série de sulfonamidas (FAMAHEY, 1997). Segundo Suleyman e colaboradores (2008), o mecanismo de ação da Nimesulida se resume em inibição da COX e lipoxigenase e seus produtos finais, inibição dos radicais tóxicos de oxigênio e a secreção de enzimas do lisossoma, prevenção da agregação e a adesão e quimiotaxia de neutrófilos. Estudos feitos por Nunes e colaboradores (2013) mostraram que a Nimesulida suprime as fases aguda e crônica da inflamação e diminui a permeabilidade capilar na área inflamada, devido ao seu caráter anfifílico o fármaco se liga fortemente aos lipídios da membrana celular.

Segundo Suleyman (2008), antes da descoberta da COX-2, o efeito anti-inflamatório da Nimesulida tinha sido atribuído ao seu comportamento sequestrador de radicais, que pode ser explicado pela posição *para*-nitro-sulfonil-amino-fenil na sua estrutura. Após a descoberta de inibidores da COX-2 e com a inibição seletiva desta enzima, o efeito anti-inflamatório da Nimesulida foi principalmente atribuído à presença do grupo metil-sulfonamida volumoso na molécula que favorece a forte interação do fármaco com a COX (FABIOLA et al. 1998). Nos estudos da relação estrutura-atividade, os derivados de Nimesulida que não continham o substituinte NO<sub>2</sub> apresentaram efeitos antinociceptivos mais baixos, sugerindo a importância desta subunidade na ação antinociceptiva (BEZERRA-NETO et al. 2006).



**Figura 14:** Fórmula estrutural da Nimesulida. Fonte: Próprio Autor adaptado de NUNES et al., 2013.

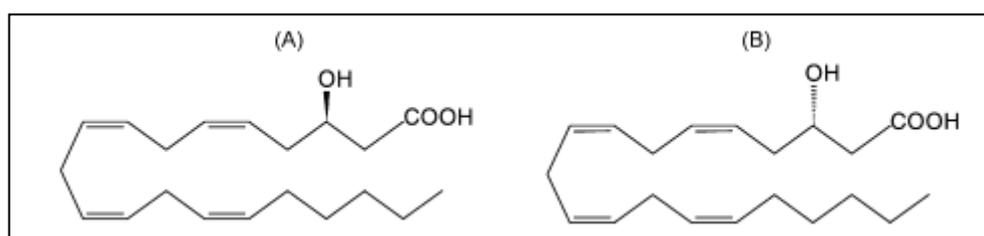
Com relação atividade antimicrobiana, Alem e colaboradores (2004) mostraram a relevante ação fungicida da Nimesulida contra *C. albicans* formadoras de biofilmes na concentração de 1mM. Esta ação antifúngica dos AINEs se deve principalmente ao fato que tanto células do hospedeiro quanto do patógeno são fontes de PGs (NOVEER et al. 2002).

## 2.5 Papel da PGs nas Infecções Fúngicas

Oxilipinas são ácidos graxos saturados ou insaturados oxidados, amplamente distribuídos na natureza e que constituem vários compostos incluindo os eicosanoides tais como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (MITCHELL et al. 1994). Dentre os vários prostanóides formados a partir da conversão do ácido araquidônico em PGH<sub>2</sub>, a prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) é um dos produtos primários gerados deste metabolismo e é responsável pela inibição da ação linfocitária e outras células envolvidas em resposta alérgica e anti-inflamatória (KUMMER e COELHO, 2002).

Stodola e colaboradores (1967) identificaram a primeira oxilipina produzida por fungos patogênicos, a 3-Hidroxi-oxilipina, que também é eicosanoide como as

PGs produzidas durante a infecção. A estrutura básica da 3-Hidroxi-oxilipina compreende um grupo carboxílico (de cabeça polar) com um grupo hidroxila na posição C3 (Figura 15). Em algumas bactérias ocorre como polímero, que serve como fonte de energia ou como parte do Lipídio A que constitui o lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas. O LPS pode atuar como potentes endotoxinas (KOCK et al. 2003).



**Figura 15:** Estrutura química dos enantiômeros (A) R- e (B) S- do ácido 3-hidroxi - 5,8,11,14-eicosatetraenóico. Adaptado de KOCK et al., 2003.

Em 2002, Noveer e colaboradores, avaliaram a produção dos eicosanoides prostaglandinas E2 (PGE2), PGD2, PGF2 $\alpha$ , leucotrieno 4 (LTB4) e mostraram que fungos, incluindo dermatófitos, produzem eicosanoides na presença de ácido araquidônico exógeno. Estes autores também mostraram que as PGs controlam a mudança de fase e diferenciação destes micro-organismos. Assim, estudos vêm sugerindo que a produção de PGs por helmintos, protozoários e fungos podem contribuir para o processo infeccioso, no entanto, pouco tem sido descrito sobre os seus prováveis mecanismos de ação e sua bioquímica (KURTZMAN et al. 1974; LODWYK et al. 1997; FUNK 2001; NOVEER et al. 2001,2003; ALEM e DOUGLAS 2004,2005; QUADROS et al. 2011).

Nesse sentido, estudos relatam que fungos como *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* são capazes de produzir PGE2 *in vitro* (ERB-DOWNWARD e HUFFNAGLE, 2006, 2007; ERB-DOWNWARD E NOVEER, 2007). Castro e colaboradores (1994) e Deva e colaboradores (2000) mostraram que a *C. albicans* pode induzir a liberação de ácido araquidônico das células do hospedeiro durante a infecção, o que leva a um aumento da produção de PGE2 e modulação do crescimento celular e morfogênese fúngica. No entanto, não está bem estabelecido

se a síntese de PGs por esses micro-organismos é dependente de COX, já que não foi encontrada homologia com o gene da COX no genoma de *C. neoformans* e *C. albicans* (TSITSIGIANS et al. 2005).

Além disso, estudos revelaram a existência de três sequências de genes que codificam enzimas que atuam sobre os ácidos graxos fúngicos (PpoA, PpoB e PpoC) em *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus fumigatus* e o domínio catalítico destas enzimas são semelhantes ao domínio da COX de mamíferos (TSITSIGIANNIS et al. 2005). Esse fato, pode justificar as investigações com o uso de AINEs como agentes antifúngicos, visto que esta ação pode estar associada a inibição de uma enzima similar a COX humana, que leva a inibição de produtos lipídicos fúngicos, similares as PGs.

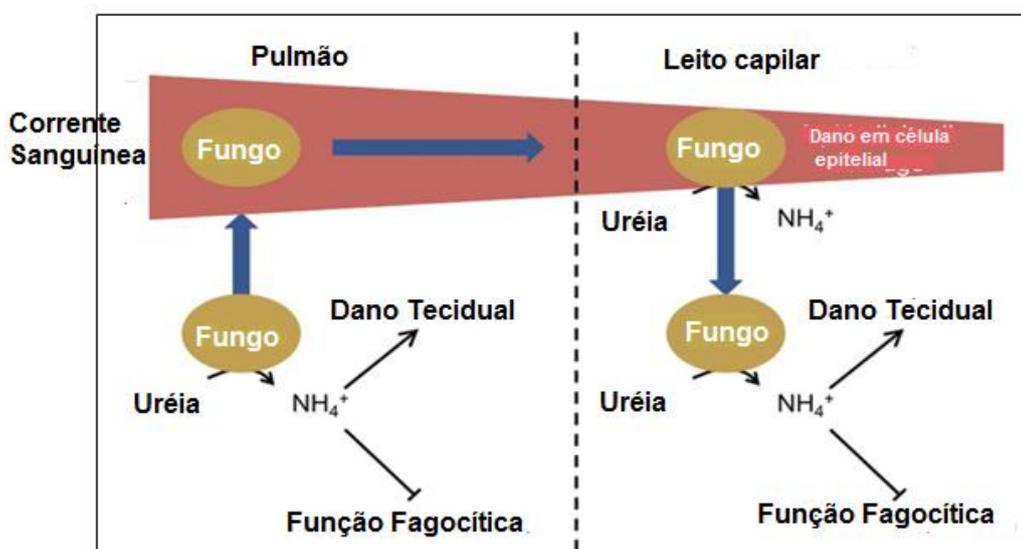
## **2.6 Urease: enzima associada a patogenicidade nas infecções fúngicas.**

A urease (urea amidohidrolase), enzima responsável pela hidrólise da uréia em amônia e carbamato, é uma das enzimas mais importantes para a medicina (DIXON e WALSH, 1992). Sua importância enzimática inclui: a sua capacidade para servir como um fator de virulência nas infecções humanas e animais do trato urinário e gastrointestinal, o seu papel na reciclagem de resíduos nitrogenados e a sua importância nas transformações ambientais de compostos azotados, incluindo os adubos à base de ureia (MOBLEY e HAUSINGER, 1989). Mobley e colaboradores (1995), relataram que a urease é um fator de virulência determinante no desenvolvimento de infecções bacterianas do trato urinário e de pielonefrite aguda.

O papel de urease na virulência de patógenos bacterianos está bem estabelecida, no entanto, estudos mais recentes destacam a função da urease durante infecções fúngicas, sugerindo que esta enzima tem um papel importante durante o processo de invasão fúngica (RHODS et al. 1988; COX et al. 2000; NOVEER et al. 2003; ZIMMER et al. 2009).

Há vários relatos de que inúmeras espécies de fungos produzem urease, tais como as do gênero *Aspergillus*, fungos dermatófitos e *Cryptococcus neoformans*.

Com isso, apresentam a capacidade de hidrolisar a uréia que é um importante fator de virulência do fungo (RHODS et al. 1988; SMITH et al. 1993; COX et al. 2000; NOVEER et al. 2003). Estudos feitos com camundongos com doença pulmonar causada por *C. neoformans* mostraram que a urease está envolvida na evasão do sistema imune (Figura 16) e que a toxicidade da amônia às células do hospedeiro promove doenças sistêmicas (RUTHERFORD, 2014). Tal fato ocorre porque cepas de fungos patogênicos produtoras de urease induzem uma resposta imune não protetora ao hospedeiro (resposta do tipo T helper 2 -Th2) que inibe a resposta fungicida (resposta Th1) (OSTERHOLZER et al. 2009). Em 1988, Summerbell e colaboradores mostraram que alguns fungos dermatófitos são urease positivos, principalmente o *T. mentagrophytes*, porém estes estudos ainda são relativamente escassos. Com isso, o surgimento de novos fármacos com a capacidade de inibir a urease e outras enzimas relacionadas ao mecanismo de virulência como proteases e outras se faz importante no meio clínico.



**Figura 16:** Modelo mostrando a função da urease durante infecção fúngica pulmonar. Fonte: adaptado de Rutherford (2014).

Desta forma, com a descoberta de que fungos patogênicos produzem eicosanoides, expressam enzimas semelhantes a COX e ureases, expandiu-se as áreas de investigações que focam em novas estratégias farmacológicas de grande

interesse da área clínica e farmacêutica, visto que, estas moléculas são possíveis alvos de ação de fármacos como os AINES e inibidores enzimáticos, o que os tornam potenciais terapêuticos em doenças fúngicas (NOVEER et al. 2002; QUADROS et al. 2011).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a atividade antifúngica da Nimesulida isolada ou em combinação com a terbinafina frente aos fungos dermatófitos, assim como investigar possíveis mecanismos de ação deste fármaco.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a atividade antifúngica por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) da Nimesulida frente aos fungos dermatófitos.
- Avaliar a atividade antifúngica por meio da determinação de CIM e de CFM da Terbinafina frente aos fungos dermatófitos.
- Investigar se o mecanismo de ação da Nimesulida está associado a produção de Prostaglandina E2 e urease, na espécie de dermatófitos que apresentar melhor CFM nos ensaios antifúngicos.
- Determinar o Concentração Inibitória Fracionária (FIC) e Índice Inibitório Fracionário (FIX) da combinação da Nimesulida e da Terbinafina frente ao dermatófito com melhor ação antifúngica destes fármacos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção e manutenção da cepa testada

Para realização dos testes antifúngicos foi utilizada cepa de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, obtida a partir da coleção do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ – Rio de Janeiro), e isolados clínicos de *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* do Instituto Evandro Chagas (IEC - Belém, Pa). Estas foram mantidas em Ágar Saboraud Dextrose (ASD) à temperatura ambiente no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará – UFPA. Para os ensaios, o *T. mentagrophytes*, foi semeado em placa de petri com ASD e mantido a 37 °C por cerca de 15 dias em estufa para promover o crescimento exponencial dos conídios obtendo-se culturas jovens e puras.

### 4.2 Obtenção das drogas, meios de cultura e solventes

A Nimesulida e a Terbinafina utilizados no experimento foram adquiridas na Therapeutica® Farmácia de Manipulação em Belém/Pa. O meio de cultura utilizados foram o Ágar Saboraud Dextrose (ASD) e o meio RPMI tamponado a pH 7 ambos da Himedia, Indian. Estes foram preparados a partir de uma base desidratada disponível comercialmente e conforme instruções do fabricante. O solvente Dimetil-sulfóxido (DMSO) foi adquirido na Sigma-Aldrich, USA.

### **4.3. Preparo do inóculo fúngico**

Para o preparo do inóculo foi feita a lavagem dos conídios com caldo RPMI-1640 a partir da cultura fúngica contida na placa de petri previamente semeada. Essa suspensão resultante dos conídios foi transferida para tubo de ensaio estéril e agitada no vórtex por 15 segundos, aproximadamente. Em seguida, a suspensão foi ajustada até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0.5 da escala de MacFarland correspondendo aproximadamente  $1$  a  $2 \times 10^6$  UFC/mL de *T. mentagrophytes* ATCC 9533, *T. mentagrophytes* IC, *T. rubrum*, *M. canis*, *M. gypseum* e *E. floccosum* em caldo RPMI-1640. O procedimento adotado no semeio do fungo, o preparo do inóculo e a avaliação da atividade antifúngica dos AINEs foram realizados seguindo a norma M38-A, Vol.22 N° 16 do “Método de Referência para Testes de Microdiluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada” do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2008, com adaptações.

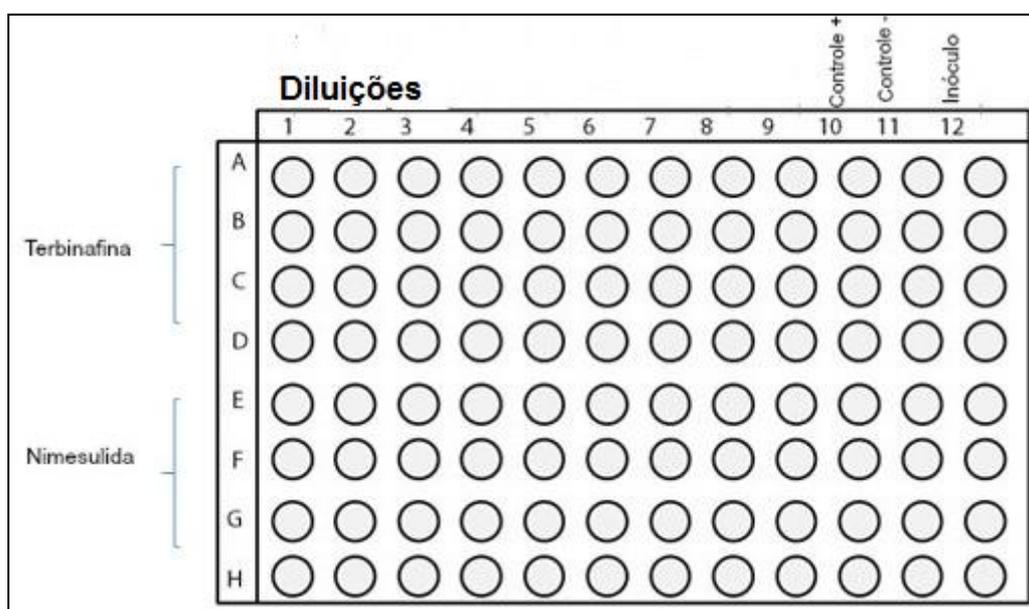
### **4.4 Preparo das Soluções de Nimesulida e de Terbinafina**

Para a realização dos testes foram preparadas soluções estoques de 1mg/mL tanto da Nimesulida quanto da Terbinafina preparadas em solução de Dimetil sulfóxido (DMSO) 10%. A PGE2 foi dissolvida em etanol 50% e usada na concentração final de 10ng/mL. Todas as soluções foram armazenadas a - 20 °C.

### **4.5 Determinação de CIM e CFM da Nimesulida e da Terbinafina frente a fungos dermatófitos a partir do método de microdiluição em caldo**

A CIM representa a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidades por diluição em ágar ou caldo sob condições conhecidas (CSLI, M38-A, 2008).

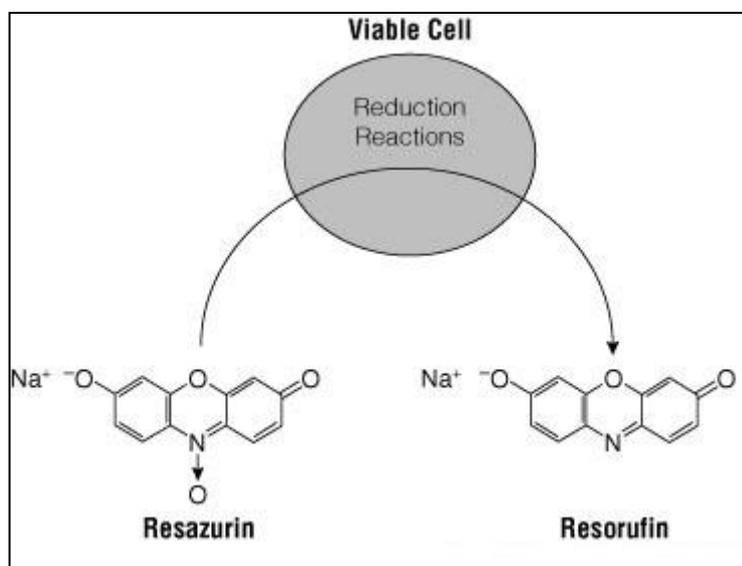
Os testes foram realizados em caldo RPMI -1640 contidos em placas “Sensitive microtier” de 96 poços em forma de U (DIFCO) estéreis (Figura 17). A partir da solução padrão de Nimesulida e de Terbinafina foram realizadas diluições seriadas até obter as concentrações finais nos poços. Em cada poço foi colocado 100 $\mu$ L de inóculo e 100 $\mu$ L da solução da droga em teste e incubado em temperatura ambiente por 48h. Para controle positivo utilizou-se o antifúngico Anfotericina B na concentração de 10mg/mL e para controle negativo foi utilizado DMSO 10%. Em seguida, a placa foi incubada a 37 °C por 48h. Todos os testes foram feitos em triplicata.



**Figura:** Esquema de distribuição na microplaca de 96 poços. Fonte: esquema do autor

Para a obtenção de CIM foi utilizado o parâmetro da mudança de coloração obtida no teste colorimétrico utilizando a resazurina (MONTEIRO et al. 2012). A resazurina é um corante com ótima solubilização em água e apresenta uma coloração azul, utilizado como referência em testes para verificar a viabilidade de células. Na presença destas, sofre uma redução sendo transformada em resofurina e mostrando uma coloração rosa (ALVES et al. 2008; MONTEJANO et al. 2005; Figura 18). Sendo assim, após incubação, foram aplicados 15 $\mu$ L do corante resazurina em todos os poços e incubado por 24h a 37 °C. Passado esse período,

foi feita a leitura visual do resultado para identificação da CIM de cada fármaco frente ao fungo testado.



**Figura 17:** Mudança na estrutura química da resazurina após reação de redução ao entrar em contato com células viáveis.

Alíquotas de 10 $\mu$ L de cada poço foram semeadas em placas de petri contendo ASD seguindo a técnica de “Pour Plate” e mantidas a 37 °C por 72h para posterior leitura das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Os dados foram expressos em número de UFC (x10<sup>6</sup>) das espécies testadas por concentração dos fármacos.

#### 4.6 Avaliação do efeito de PGE2 exógena na atividade antifúngica da Nimesulida.

Para confirmação se o mecanismo de ação da Nimesulida é dependente de PGE2, adicionou-se em placa “Sensitiver microtiter” de 96 poços 90  $\mu$ L da concentração referente ao CFM da Nimesulida para cada fungo em teste juntamente

com 100  $\mu\text{L}$  do inóculo fúngico ( $1$  a  $2 \times 10^6$ ). Em seguida foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de PGE2 na concentração de 10 ng/mL. A placa foi incubada a 37 °C em estufa microbiológica por 48 horas, após esse tempo 10  $\mu\text{L}$  de cada poço foi semeado pela técnica de “Pour Plate” conforme citado anteriormente. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa microbiológica por 72h para posterior leitura das UFC (Quadros et al. 2011), com adaptações. A partir da contagem de UFC em placas foi possível avaliar o efeito da PGE2 no crescimento fúngico. Todos os testes foram realizados em triplicata.

#### **4.7 Determinação da produção de urease por fungos dermatófitos**

Após crescimento exponencial em ASD das cepas selecionadas para o teste da produção de urease, foi realizado a determinação da produção enzimática pelo método quantitativo, segundo Weatherburn 1967, com adaptações, onde ocorre a inspeção visual da mudança de coloração para vermelho fenol no meio causada pela liberação de amônia por meio da hidrólise da uréia pela enzima urease nos tubos de cultura. A intensidade da mudança de cor foi correlacionada com a produção de enzima.

As reações foram feitas em tubo de ensaio contendo previamente caldo ureia ao qual foi adicionado a suspensão fúngica de turbidez correspondente ao tubo 2 da escala de MacFarland (Cox et al. 2000), em seguida homogeneizada. Os tubos foram cultivados a 37 °C e observados por 15 dias. Após esse tempo a mudança de cor dos tubos foi analisada visualmente e fotografada para registro. Todos os testes foram feitos em triplicata.

#### 4.7.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA NIMESULIDA SOBRE A PRODUÇÃO DE UREASE EM FUNGOS DERMATÓFITOS

Em tubos de ensaio contendo caldo uréia juntamente com a suspensão fúngica de turbidez correspondente ao tubo 2 da escala de MacFarland (Cox et al. 2000), foram adicionadas as concentrações de CFM da Nimesulida por tubo atingindo um volume final de 3000  $\mu$ L. Em seguida, os tubos foram cultivados a 37°C e observados durante 15 dias para leitura visual e observação da mudança de coloração dos meios. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os resultados de viabilidade do fungo foram confirmados pela técnica de “Pour Plate” já citada anteriormente, onde o volume de 100  $\mu$ L de cada solução após período de incubação foi semeado em placas de ASD e incubadas a 37 °C por 72h para posterior leitura das UFC.

#### 4.8 Teste de Sinergismo Nimesulida/Terbinafina

A interação de Nimesulida e Terbinafina foi estimada pelo método de microdiluição em caldo segundo norma M38-A da CLSI (2008) para testar a sinergia. Os testes foram realizados em caldo RPMI 1640 contidos em placas “Sensitive microtier” de 96 poços em forma de U (DIFCO) estéreis. A partir da solução padrão de Nimesulida e de Terbinafina foram realizadas diluições seriadas até obter as seguintes concentrações finais nos poços: 0,008; 0,004; 0,002; 0,001; 0,0005 e 0,00023  $\mu$ g/mL. Em cada poço foi colocado 100 $\mu$ L de inóculo e 100 $\mu$ L da solução final das drogas na concentração do CIM de ambas (0,002  $\mu$ g/mL) nas seguintes proporções: 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1 de Nimesulida e Terbinafina respectivamente (VAN VUUREN et al. 2008; MABONA et al. 2013). Seguiu-se então a incubação em temperatura ambiente por 48h. Para controle positivo utilizou-se o antifúngico Anfotericina B na concentração de 10mg/mL e para controle negativo foi utilizado DMSO 10%. Em seguida, a placa foi incubada a 37 °C por 48h. Para obtenção do CIM foi usado o teste colorimétrico da resazurina, método

anteriormente citado. Os testes de sinergismo foram feitos em duplicata e baseados em ensaio feito por Mabona e colaboradores (2013).

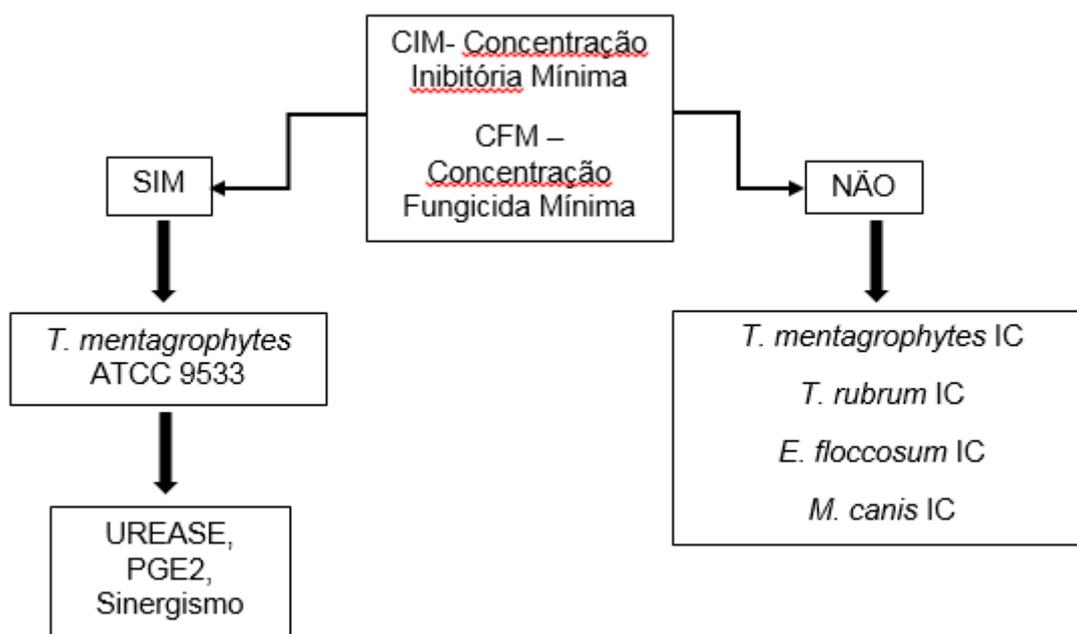
O índice inibitório fracionário (FIX) foi calculado como sendo:

FIX= Concentração Inibitória Fracionária Terbinafina (FIC) + FIC de Nimesulida

FIC Terbinafina = MIC Terbinafina em combinação / MIC Terbinafina sozinha

FIC Nimesulida= MIC Nimesulida em combinação / MIC Nimesulida sozinha

Os resultados foram interpretados como: sinérgico ( $\leq 0,5$ ) e indiferente (0,5 – 4) (ARAI *et al*, 2005). A seleção das espécies que passariam por todas as etapas de testes seguiu os critérios do esquema abaixo (Figura 19)



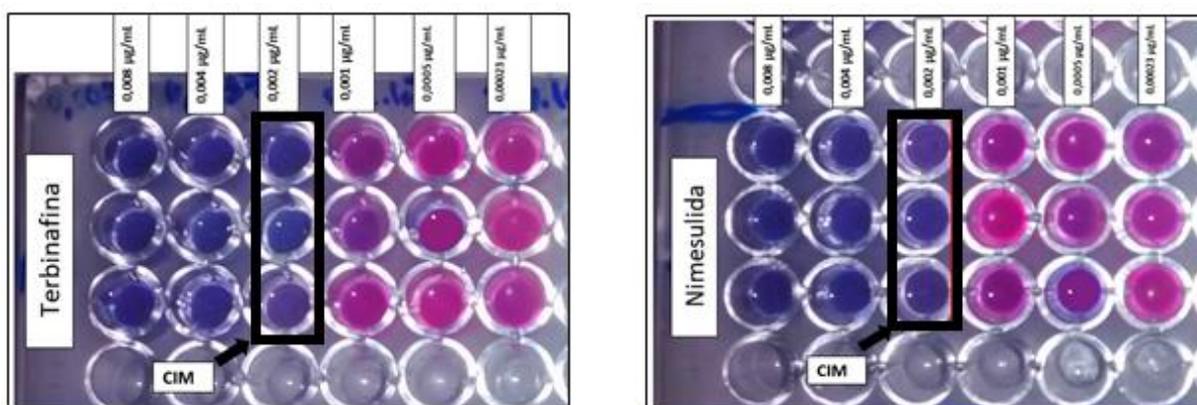
**Figura 18:** Esquema “*screening*” de seleção de espécies para teste de urease, PGE2 e sinergismo.

## 5 RESULTADOS

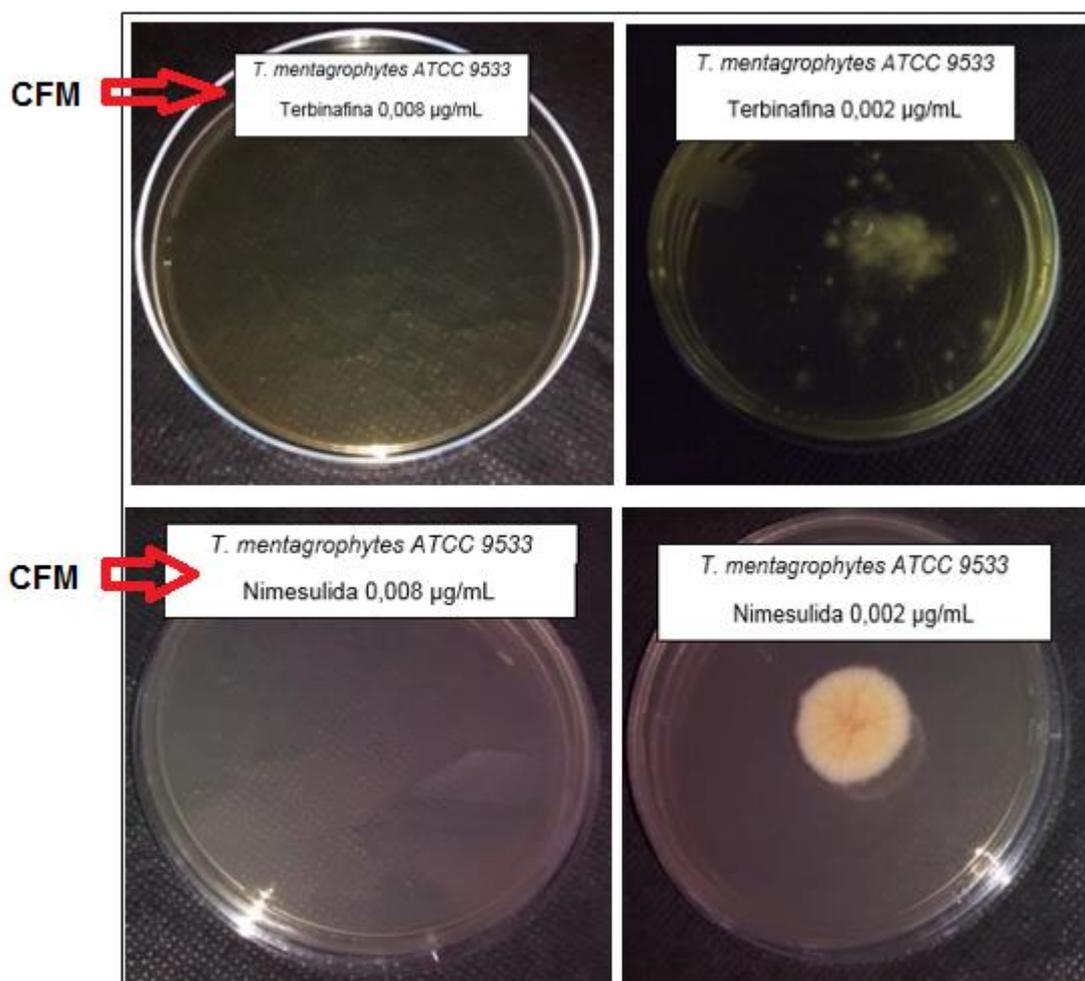
### 5.1 Determinação de CIM e CFM da Terbinafina e da Nimesulida frente aos Dermatófitos.

#### 5.1.1 *T. mentagrophytes*

O resultado da atividade antifúngica da Terbinafina frente a *T. mentagrophytes* ATCC 9533, pelo método da microdiluição em placa mostrou que a CIM foi obtida na concentração de 0,002 µg/mL, o mesmo resultado foi observado para a Nimesulida (Figura 20). Após a técnica de “Pour Plate”, a CFM também se apresentou na concentração de 0,002 µg/mL para ambas drogas testadas (Figura 21).

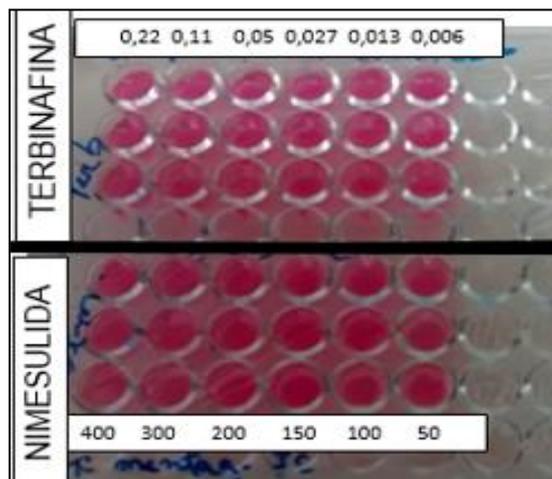


**Figura 19:** Ensaio de microdiluição em placa com adição de resazurina para obtenção do CIM da Terbinafina e Nimesulida frente a *T. mentagrophytes* ATCC 9533.

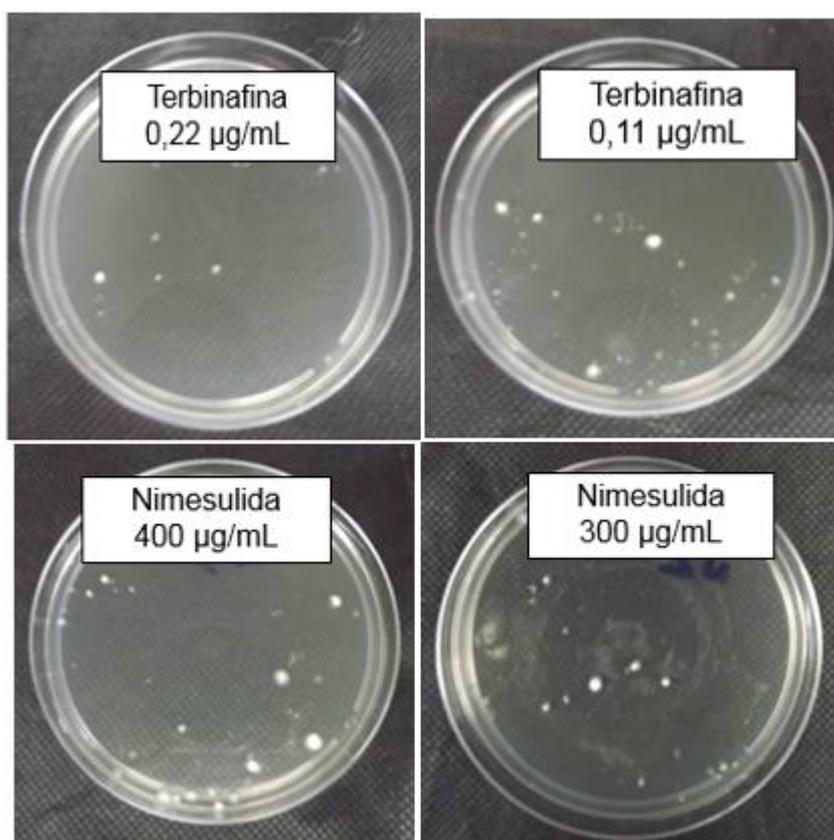


**Figura 20:** CFM pela técnica de “Pour Plate” para Terbinafina e Nimesulida frente a *T. mentagrophytes* ATCC 9533.

Para o isolado clínico de *T. mentagrophytes*, a CIM e CFM da Terbinafina foram iguais  $> 0,22 \mu\text{g/mL}$ , enquanto a CIM e CFM da Nimesulida foi maior que  $400 \mu\text{g/mL}$  (Figura 22 e 23).



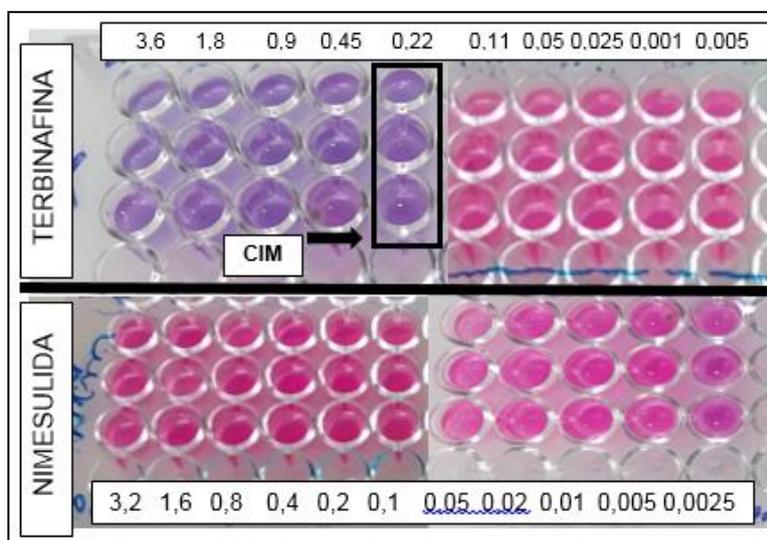
**Figura 21:** Ensaio com resazurina para obtenção do CIM da Terbinafina e Nimesulida frente *T. mentagrophytes* isolado clínico pelo método de microdiluição em placa.



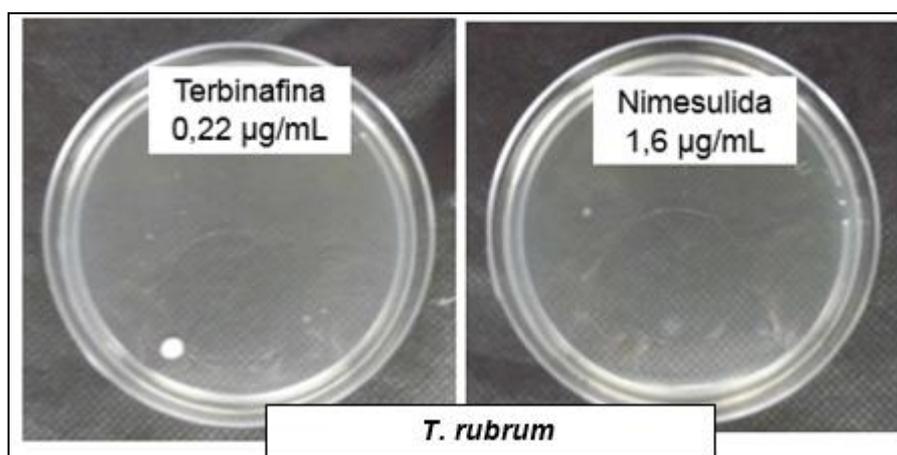
**Figura 22:** CFM pela técnica de "Pour Plate" para Terbinafina (CFM > 0,22 µg/mL) e Nimesulida (CFM > 400 µg/mL) frente a *T. mentagrophytes* isolado clínico.

5.1.2 *T. rubrum*

Na atividade antifúngica da Terbinafina e Nimesulida frente a *T. rubrum*, observou-se que a Terbinafina apresentou CIM na concentração 0,22 µg/mL, enquanto a CIM da Nimesulida foi maior que 3,2 µg/mL (Figura 24). O CFM para Terbinafina foi > 0,22 µg/mL e o da Nimesulida > 1,6 µg/mL (Figura 25).



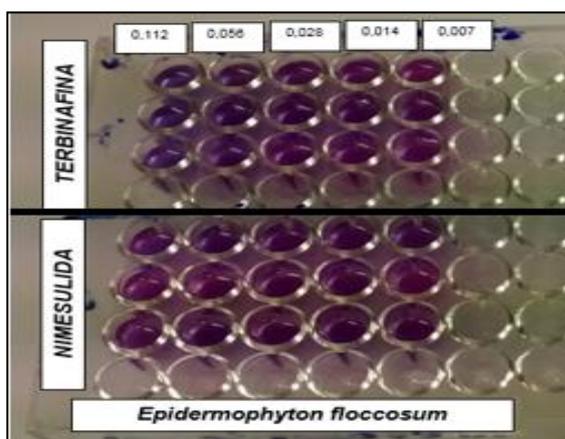
**Figura 23:** Ensaio de microdiluição em placa com adição de resazurina para obtenção do CIM da Terbinafina e Nimesulida frente *T. rubrum*.



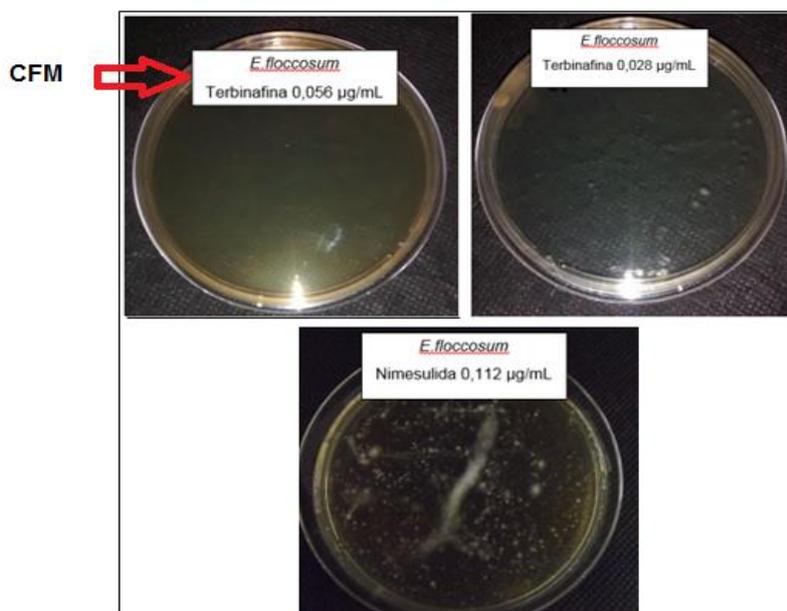
**Figura 24:** CFM pela técnica de "Pour Plate" para Terbinafina (>0,22 µg/mL) e Nimesulida (>1,6 µg/mL) frente a *T. rubrum*.

### 5.1.3 *E. floccosum*

Frente a *E. floccosum*, a CIM da Terbinafina e da Nimesulida foram maiores que 0,112  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 26). No entanto, a Terbinafina obteve a CFM na concentração de 0,056  $\mu\text{g/mL}$  e a Nimesulida, na concentração maior que 0,112  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 27).



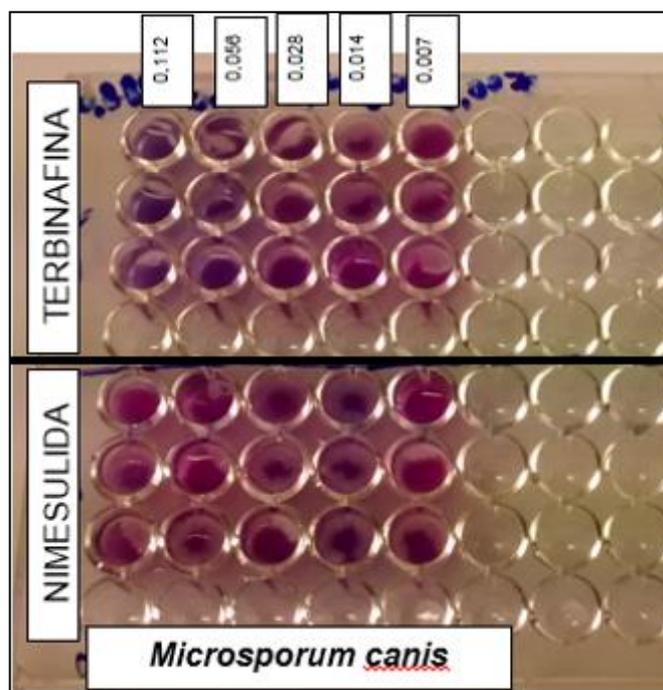
**Figura 25:** Ensaio de microdiluição em placa com adição de resazurina para obtenção do CIM da Terbinafina e Nimesulida frente *E. floccosum*.



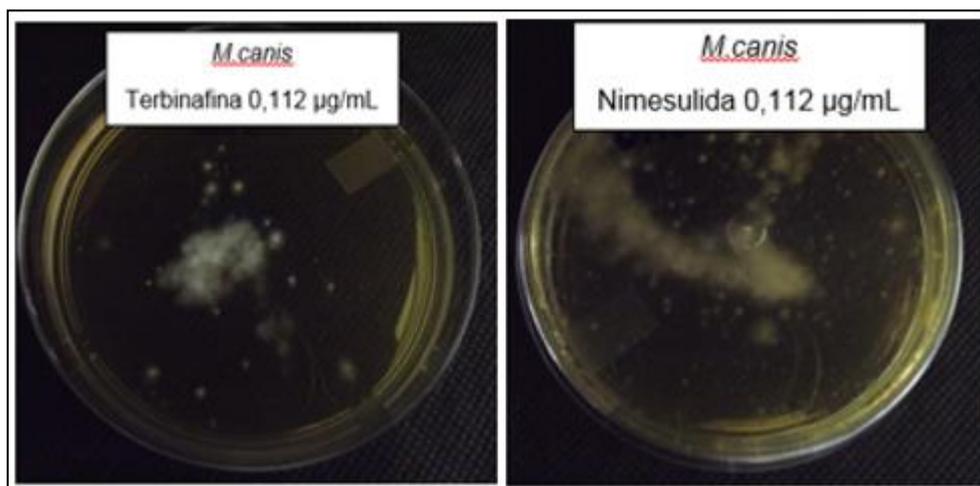
**Figura 26:** CFM pela técnica de "Pour Plate" para Terbinafina e Nimesulida frente a *E. floccosum*.

5.1.4 *M. canis*

A CIM e a CFM tanto para a Terbinafina quanto para Nimesulida frente a *M. canis* foram obtidas na concentração maior que 0,112  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 28 e 29).



**Figura 27:** Ensaio de microdiluição em placa com adição de resazurina para obtenção do CIM da Terbinafina e Nimesulida frente *M. canis*.



**Figura 28:** CFM pela técnica de "Pour Plate" para Terbinafina ( $>0,112 \mu\text{g/mL}$ ) e Nimesulida (CFM  $>0,112 \mu\text{g/mL}$ ) frente a *M. canis*.

Os resultados de CIM e CFM para os dermatófitos testados podem ser vistos resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 Valores de CIM e CFM da Nimesulida frente a dermatófitos IC-isolado clínico.

Fungo	Nimesulida ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	CIM	CFM
<i>T. mentagrophytes ATCC 9533</i>	0,002	0,008
<i>T. mentagrophytes IC</i>	>400	>400
<i>T. rubrum IC</i>	>1,6	>1,6
<i>E. floccosum IC</i>	>0,112	>0,112
<i>M. canis IC</i>	>0,112	>0,112

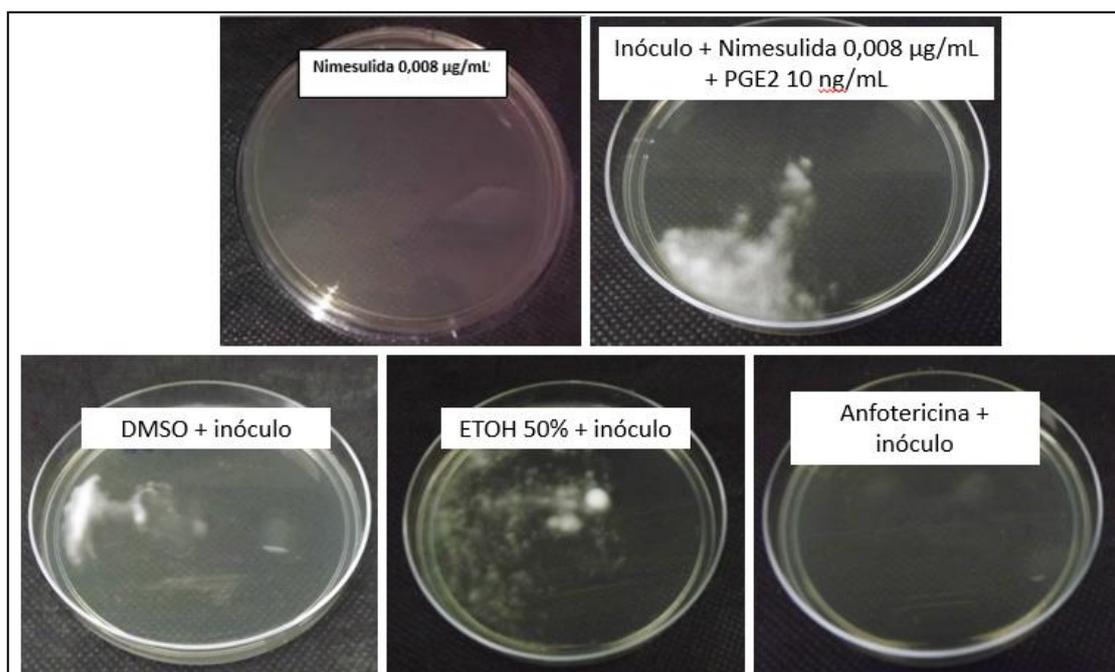
## 5. 2 Avaliação do papel de PGE2 e urease na ação antifúngica da Nimesulida

As avaliações dos efeitos da PGE2 e da produção de urease na atividade antifúngica da Nimesulida foram realizadas a partir da determinação de CFM deste fármaco frente aos dermatófitos. Após a realização dos testes de microdiluição, o dermatófito, *T. mentagrophytes ATCC 9533*, foi o que mostrou maior sensibilidade a Nimesulida, ou seja, com menor valor de CFM. Com isto, esta cepa foi testada nos ensaios de PGE2 e urease bem como o Teste de Sinergismo.

### 5.2.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PGE2 EXÓGENA NA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA NIMESULIDA FRENTE *T. mentagrophytes ATCC 9533*.

O efeito da PGE2 sobre a ação fungicida da Nimesulida no crescimento do *T. mentagrophytes ATCC 9533* foi avaliado pela adição ou não de PGE2 exógena no cultivo contendo o inóculo e a CFM da Nimesulida, seguindo a metodologia de microdiluição em caldo e a avaliação do crescimento pela técnica de "Pour Plate", semelhante ao ensaio para obtenção de CIM e CFM descrito em métodos.

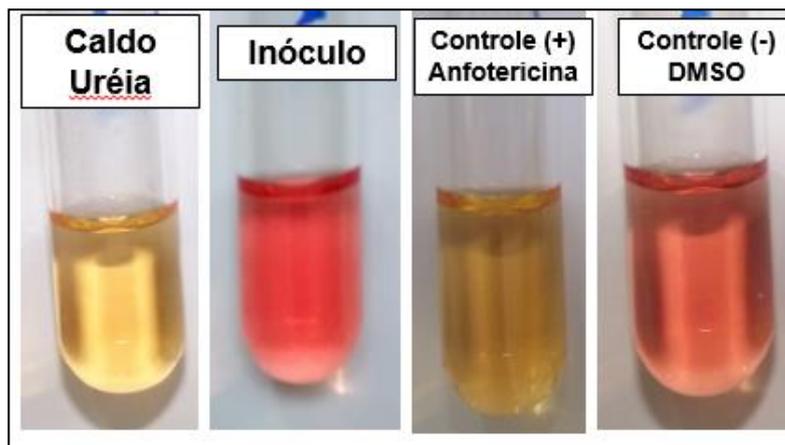
Na figura 30, observa-se que com a adição de PGE2 nas culturas fúngicas na presença do CFM da Nimesulida, foi capaz de reverter completamente a inibição do crescimento de *T. mentagrophytes* ATCC 9533 induzido pelo fármaco.



**Figura 29:** Ação da PGE2 sobre o efeito inibitório da Nimesulida em *T. mentagrophytes* ATCC 9533 pela Técnica de “Pour Plate”.

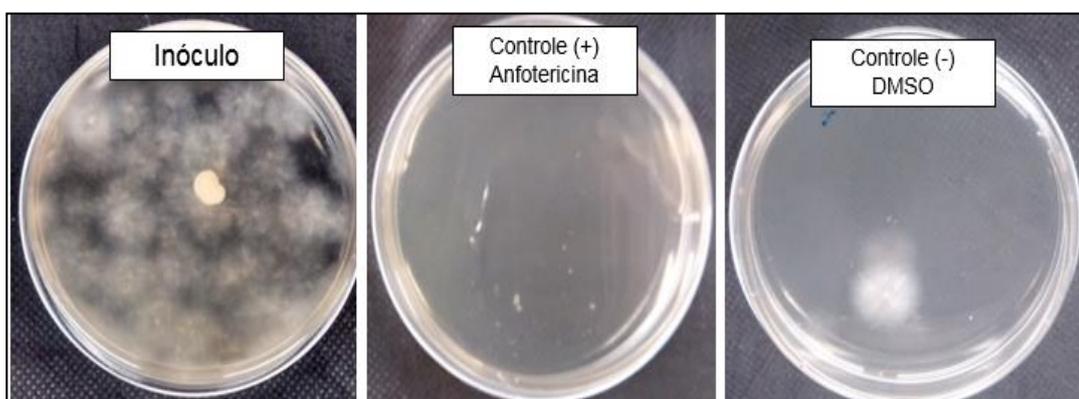
### 5.2.2 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE UREASE POR *T. mentagrophytes* ATCC 9533.

O resultado demonstrou que a espécie analisada é produtora de urease conforme figura 31, visto que ocorreu a mudança na coloração do meio de amarelo para vermelho fenol, devido a hidrólise da ureia pela enzima urease produzida pelo *T. mentagrophytes* ATCC 9533, com liberação de amônia no meio. O controle positivo, a Anfotericina B, foi capaz de inibir a produção de urease produzida pelo fungo (meio permaneceu amarelo), enquanto que no meio contendo DMSO/Etanol não houve alteração na produção da enzima (meio vermelho fenol).



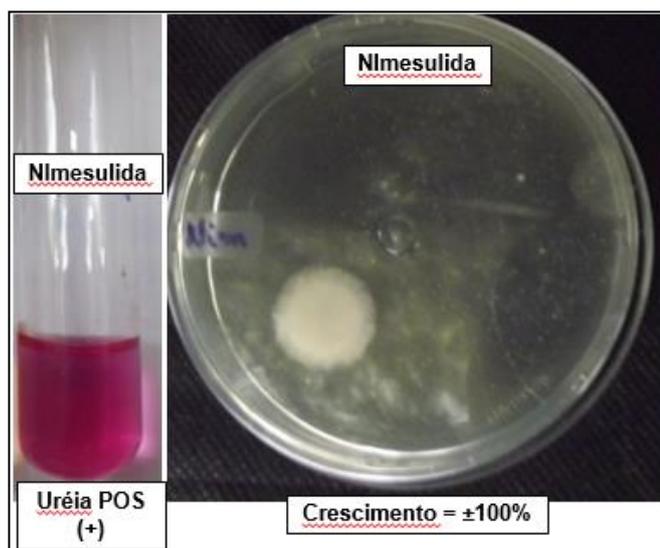
**Figura 30:** Ensaio enzimático de urease mostrando a produção da enzima pelo *T. mentagrophytes* ATCC 9533.

A técnica de “Pour Plate” confirmou a viabilidade do *T. mentagrophytes* ATCC 9533 no ensaio da urease (Figura 32) e mostrou que a Anfotericina inibiu o crescimento fúngico enquanto o DMSO/Etanol não alterou o crescimento fúngico.



**Figura 31:** Técnica de “Pour Plate” para produção de urease em *T. mentagrophytes* ATCC 9533: inóculo, controle positivo e controle negativo.

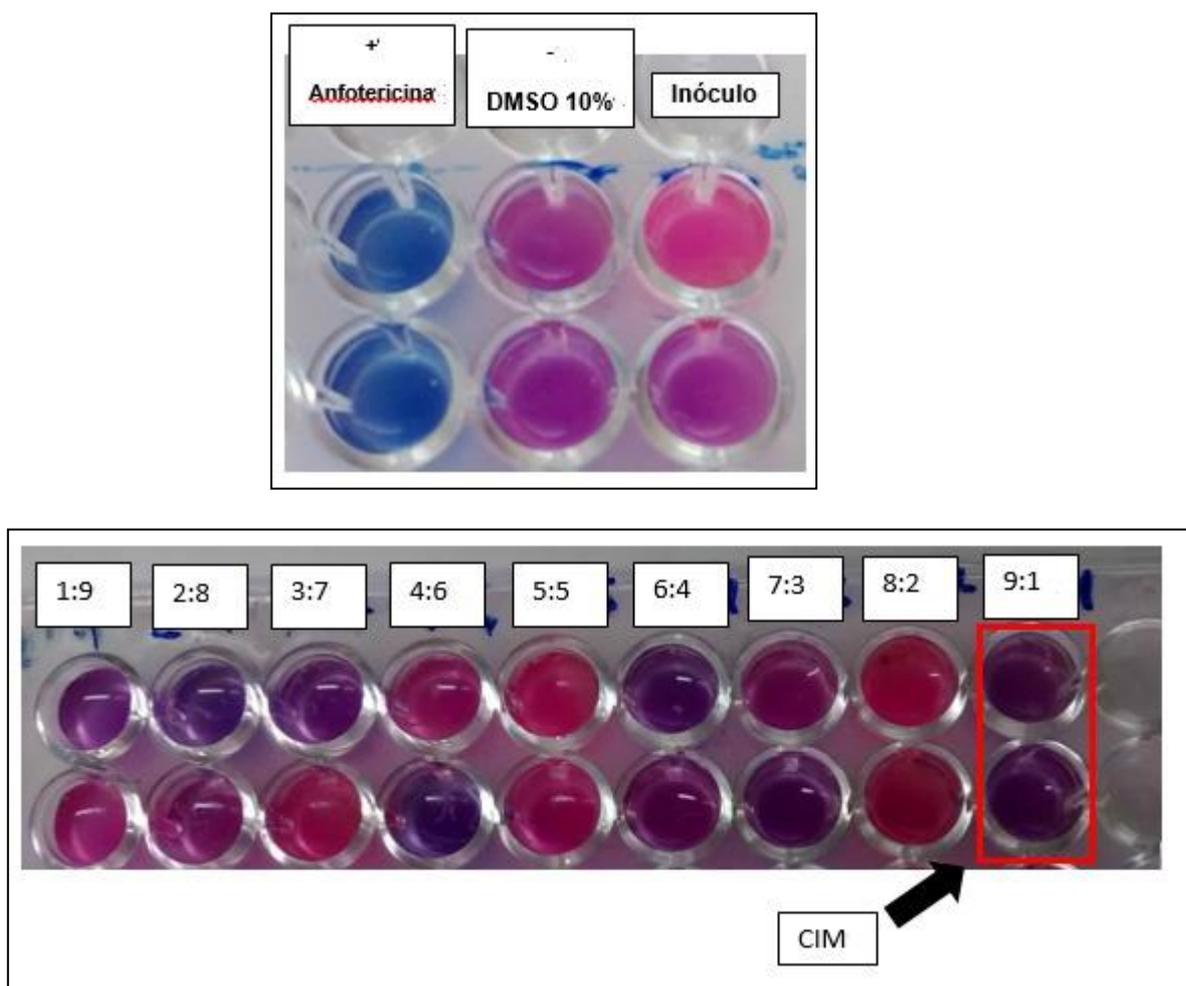
No ensaio com a CFM da Nimesulida em meio contendo ureia, a figura 30 mostra que este fármaco não conseguiu inibir a produção de urease pelo *T. mentagrophytes* ATCC 9533 (meio vermelho fenol), assim como perdeu a capacidade de matar completamente o fungo, conforme mostrado pela técnica de “Pour Plate” (Figura 33).



**Figura 32:** Teste de inibição da urease em tubo com Nimesulida; técnica de “Pour Plate” do tubo de urease.

### **5.3 Determinação do CIM a partir do sinergismo entre Nimesulida associada a Terbinafina frente ao *T. mentagrophytes* ATCC 9533.**

Os resultados demonstram que o CIM ficou na proporção 9:1 (MIC da associação: concentração da terbinafina 0,0002 µg/mL, e concentração da Nimesulida 0.0018). Estes dados mostram que houve uma amplificação de 10 vezes na potência da Terbinafina quando associada com Nimesulida (Figura 34). No entanto, os valores de FIC e FIX, expressos na tabela 2, relaciona que esta associação se mostrou indiferente (FIX > 1), de acordo com os autores Arai e colaboradores (2005) e Malbona e colaboradores (2013) que descrevem FIC como: < 0,5 (sinérgico) e de 0,5 – 4 (indiferente).



**Figura 33:** CIM da associação Nimesulida/Terbinafina (respectivamente) na proporção 9:1; controle Negativo (Inóculo + DMSO); controle Positivo (Inóculo + Anfotericina B); Inóculo.

Tabela 3 Resultados de FIC da Terbinafina; FIC da Nimesulida e FIX. Nim.- Nimesulida; Terb – Terbinafina.

FUNGO	CIM Terbinafina (Terb - $\mu\text{g/mL}$ )			CIM Nimesulida (Nim - $\mu\text{g/mL}$ )			Resultado	
	Terb Combinada	FIC Ter	Nim Sozinha	Nim Combinada	FIC Nim	FIX índice	Interpretação	
<i>T. mentagrophytes</i>	0.002	0,0002	0,1	0.002	0.00180	>1	>1	indiferente

## 6 DISCUSSÃO

As infecções fúngicas causadas por fungos dermatófitos tem sido motivo de preocupação mundial principalmente com o avanço das doenças autoimunes. Nesse sentido, desde a década de 1980, novos agentes antifúngicos têm sido introduzidos na terapia de micoses superficiais e sistêmicas um exemplo são as Alilaminas (ODDS et al. 2003). O principal representante desta classe é a Terbinafina, um fármaco que alcança níveis elevados no estrato córneo sendo necessário doses 10 a 100 vezes maiores que o CIM, para ação sistêmica, devido a sua característica lipofílica (LESHER, 1999). Poucos efeitos colaterais e baixa toxicidade foram relatados com o uso prolongado da Terbinafina, porém o tratamento longo propicia altos níveis de abandono da terapia.

O gênero *Trichophyton* é o maior responsável pelas dermatofitoses, sendo a espécie *T. rubrum* a mais comum, seguida pela espécie *T. mentagrophytes*. Em terceiro lugar, vem a espécie *E. floccosum*, e depois *M. canis*. Os valores de CIM da Terbinafina e Nimesulida encontrados neste estudo foram altos para os isolados clínicos de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, *E. floccosum* e *M. canis* (CIM >0,112 a > 400 µg/mL). No entanto, a CIM para a Terbinafina frente *T. mentagrophytes* ATCC 9533 foi extremamente baixa (0,002 µg/mL) quando comparado ao CIM para o isolado clínico (>400 µg/mL). Nesse sentido, Ghannoum e colaboradores (2010) demonstraram um CIM para Terbinafina que variou entre 0,002 – 0,06 µg/mL, mesma faixa encontrada para a cepa *T. mentagrophytes* ATCC 9533 deste estudo. Mukherjee e colaboradores (2003) encontraram valores de CIM de Terbinafina divergentes entre a cepa ATCC e o isolado clínico de *T. rubrum*. Esses valores chegaram a ser até 4000 vezes maiores. A Terbinafina age inibindo a síntese da enzima esqualeno epoxidase e assim aumentando os níveis tóxicos de esqualeno e diminuindo os níveis de produção do ergosterol o que interfere na função da membrana fúngica e na síntese da parede celular (LEYDEN, 1998; RYDER, 1992). Assim, Mukherjee e colaboradores (2003) sugeriram que essa diferença nos valores de CIM na mesma espécie pode estar relacionada a uma mutação no gene que codifica a esqualeno epoxidase já que houve resistência transversal cruzada com outros agentes antifúngicos inibidores da esqualeno epoxidase, porém não houve com azóis e Polienos. Além disso, sugeriram que também pode se tratar de uma

resistência primária, visto que estudos genômicos não revelaram diferenças genéticas entre as espécies. Neste sentido, a busca de fármacos com diferentes mecanismos de ação pode ser uma alternativa terapêutica podendo até reduzir a dose quando usados em associação (LIU et al. 2014).

Estudos *in vitro* vêm demonstrando que fungos patogênicos são capazes de produzir PGs que atuam como fatores de virulência aumentando o crescimento fúngico. Essas PGs também são importantes na regulação da resposta imune do hospedeiro promovendo a colonização e infecção crônica por meio do crescimento fúngico (NOVERR et al. 2003). Sendo assim, fármacos que atuem inibindo a via de produção dessas PGs, como os inibidores de COX podem ser alternativas eficazes como agentes antifúngicos. Dentre estes, tem-se o AINE Nimesulida, um inibidor seletivo de COX-2 (VANE, 1971; NOVERR et al. 2001).

Os AINEs agem inibindo a via da produção de eicosanoides envolvidos no processo inflamatório, tais como PGs (VANE, 1971). Neste estudo, o valor de CIM para a Nimesulida frente a cepa *T. mentagrophytes* ATCC 9533 também foi extremamente baixo (0,002 µg/mL) semelhante a terbinafina, concentração bem menor que a encontrada por Al-Janabi (2011) que pode ser explicado por se tratar de uma cepa padrão. Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* demonstraram o efeito antifúngico do Ibuprofeno frente ao *T. mentagrophytes* com CIM estimado em 200 µg/mL (AL-JANABI, 2009). Al-Janabi (2011) demonstrou o efeito antifúngico de outros AINEs frente ao *T. mentagrophytes*, como o Celecoxibe (CIM 1000 µg/mL), Diclofenaco (CIM 700 µg/mL) e Meloxicam (CIM 500 µg/mL).

Os valores de CIM e CFM de Nimesulida não foram encontrados para os isolados clínicos dos demais dermatófitos, incluindo o isolado clínico de *T. mentagrophytes*, mesmo em concentrações acima de 400 µg/mL. Sendo assim, a Nimesulida não foi capaz de inibir o crescimento destes fungos. Tal fato pode ser resultado do polimorfismo genético presente em cepas de isolados clínicos que sofreram muitos repiques e expressam vários fatores de virulência (MUKHERJEE et al, 2003). Nesse sentido, Chowdhury e colaboradores (2003) mostraram que o inibidor de COX, Flurbiprofeno, foi capaz de inibir o crescimento de fungos patogênicos (*Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. interdigitale*, *Microsporum fulva*, *M. gypseum*, *M. canis*, *Epidermophyton floccosum*, *C. albicans* e *Aspergillus niger*) em concentrações abaixo de 64 µg/mL *in vitro*.

Quanto a importância da PGE2 na patogênese fúngica, nossos dados mostraram que a adição de 10ng/mL de PGE2 exógena foi capaz de reverter totalmente a inibição do crescimento de *T. mentagrophytes* ATCC 9533 induzida pela CFM da Nimesulida *in vitro*. Isso sugere que a produção de eicosanoides por patógenos fúngicos pode estar associada a indução do crescimento fúngico (NOVEER et al. 2002). Estudos anteriores realizados por nosso grupo também relataram que AINEs, como Indometacina (CFM 0,11 mmol/L), Aspirina (CFM 0,00 mmol/L), Ibuprofeno (CFM 0,44 mmol/L) e Salicilato de sódio (22 mmol/L) foram capazes de inibir o crescimento de *Candida albicans* e sugeriram a possibilidade de existir uma via dependente de COX envolvida na produção de PGE2 pelo fungo (QUADROS et al. 2011). Alem e Douglas (2004) também mostraram o importante papel de PGE2 sobre o efeito antifúngico de inibidores da COX sobre cepas de *C. albicans* formadora de biofilme, na qual a Nimesulida diminuiu cerca de 85% da formação de biofilme após 48h do cultivo, e a adição de PGE2 em cultura reverteu 100% essa ação inibitória deste fármaco sobre o crescimento fúngico, corroborando aos estudos de Quadros e colaboradores (2011). Estudos realizados por Noverr e colaboradores (2002) demonstraram que fungos dermatófitos são capazes de produzir prostaglandinas pela adição de ácido araquidônico exógeno em meio de cultura.

Prostaglandinas são potentes reguladores da resposta imune do hospedeiro. Nos mamíferos a PGE2 pode inibir a resposta imune Th1, a fagocitose, promover a proliferação de linfócitos Th2 e a eosinofilia tecidual (PETERS-GOLDEN, 1997; DEMEURE et al. 1997). O papel das prostaglandinas no mecanismo de virulência fúngica ainda está pouco elucidado, porém avanços já tem sido feito. Em 2007, Erb-Downward e Noverr demonstraram que *C. albicans* produz uma molécula similar a PGE2 *in vitro*, visto que anticorpos monoclonais anti-PGE2 de mamíferos foram capazes de reagir a esta molécula, sugerindo uma similaridade entre as moléculas expressas por esse fungo e o hospedeiro. Além disso, estes autores também mostraram que a PGE2 fúngica é capaz de regular negativamente a resposta Th1 do hospedeiro. Estudos feitos com células mortas de *C. albicans* mostraram que a produção de interleucina 17 é influenciada pela PGE2 fúngica já que a adição de PGE2 exógena na cultura morta restaurou completamente a resposta TH17 induzida por *C. albicans* (SMEEKENS et al. 2010)

Em relação aos resultados da produção de urease, verificou-se que a espécie *T. mentagrophytes* ATCC 9533 é produtora desta enzima através da visualização da mudança de coloração para a cor vermelho fenol, causada pela liberação da amônia em meio contendo ureia (WEATHERBURN 1967). A Nimesulida não foi capaz de inibir a produção da urease e nem o crescimento de *T. mentagrophytes* ATCC 9533, sendo que visualmente se observou que este AINE estimulou a síntese da urease deste fungo. Nesse sentido, alguns compostos como o ácido úrico podem estimular a produção de fatores de virulência em *Cryptococcus*, como cápsula e urease, e assim podem potencialmente modular a resposta imune do hospedeiro durante a infecção (LEE et al. 2013).

A eliminação de azoto por meio da via de ácido úrico está presente em bactérias, plantas e fungos. Nos seres humanos, a maioria dos primatas superiores e aves, o gene urato oxidase não é funcional e, portanto, o ácido úrico não é ainda hidrolisado. Em contraste, o ácido úrico é completamente degradado a amoníaco, na maioria dos fungos (LEE et al. 2013). Sanyal e Banerjee (1983) demonstraram que a produção de urease por *T. mentagrophytes* é essencialmente constitutiva, não sendo dependente da presença de ureia no meio de crescimento e ocorrendo apenas em meio intracelular. Apesar de influenciar a formação de biofilme em outras espécies fúngicas, nos dermatófitos a ureia parece não influenciar nesta formação micelial. No entanto, níveis elevados de ureia inibem a produção de urease e conseqüentemente a massa micelial, devido a toxicidade do amoníaco e também a alteração de pH do meio (Mahmoud et al. 1996). Estudos vem sendo realizados na tentativa de identificar o gene que decodifica a urease e seu mecanismo de ativação, afim de identificar sua inter-relação com outras espécies fúngicas (HIRUMA et al. 2013).

Com a crescente incidência de infecções fúngicas ao redor do mundo e com aumento no número de relatos de resistência aos antifúngicos existentes a busca por alternativas terapêuticas ou até mesmo associações de fármacos se faz interessante (ODDS et al. 1993, 2003). Ao se fazer a associação da Terbinafina com a Nimesulida se obteve um resultado onde o CIM da associação ficou em 9:1 mostrando que houve uma potencialização em cerca de 10 vezes maior na ação da Terbinafina quando associada a Nimesulida. No entanto, segundo dados de Arai e colaboradores (2005) e Malbona e colaboradores (2013), este resultado se mostra indiferente já que os valores de FIX foram maiores que 1. Estes mesmos índices

também foram padronizados por Tamura e colaboradores (2014) em testes de determinação de FIX para seis agentes antifúngicos combinados, incluindo a Terbinafina, frente a fungos dermatófitos. Scott e colaboradores demonstraram o efeito sinérgico do Ibuprofeno (AINE) sobre a ação antifúngica do Fluconazol (antifúngico azol) frente as cepas de *C. albicans*. Tamura e colaboradores (2014) também testou o sinergismo entre o antifúngico azol Itraconazol e fármaco de Amorolfina frente as cepas de dermatófitos, e observou que entre as mesmas espécies de diferentes isolados clínicos foram obtidos resultados dispares entre sinérgico e indiferente. Além disso, Weig e Müller (2001) demonstraram o efeito sinérgico da administração oral de Terbinafina e Voriconazol em pacientes HIV-positivos infectados por *C. albicans* e sugeriram que esse sinergismo foi devido ao bloqueio em diferentes níveis na síntese do ergosterol, porém este efeito necessita de maiores investigações. Existem poucos dados na literatura sobre terapias combinadas e sensibilidade dos fungos dermatófitos aos fármacos *in vitro* (GÓMEZ-LOPÉZ et al. 2006; ARJENTA et al. 2008; YU et al. 2008). Nesse sentido, um dos estudos foi realizado por Biancalana e colaboradores (2011) que investigaram a o efeito da combinação da Terbinafina com os azóis, itraconazol e voriconazol, ou a anfotericina B contra fungos dermatófitos *in vitro*. Os resultados demonstraram efeitos sinérgicos ou indiferentes, porém nenhum antagônico foi observado, mostrando que uma combinação de drogas pode ter efeito benéfico no tratamento e encorajando novas pesquisas nessa área.

Com isso, alguns estudos mostram que os inibidores da síntese de PGs podem ser futuros alvos no desenvolvimento de agentes antifúngicos atuais (ALEM & DOUGLAS 2004; NOVERR et al. 2003; Al-Janabi 2009, 2011; QUADROS et al. 2011; Malbona et al. 2013). Sendo assim, os dados deste estudo mostraram que a Nimesulida tem potencial terapêutico como alternativa principal ou complementar aos antifúngicos comerciais. Entretanto, novas investigações devem realizadas, inclusive visando o desenvolvimento de análogos de Nimesulida que podem ser estudados por modelagem molecular e outras técnicas atuais.

## 7 CONCLUSÕES

- A Terbinafina e a Nimesulida apresentaram atividade antifúngica, principalmente frente a cepa *T. mentagrophytes* ATCC 9533.
- A Nimesulida mostrou que seu mecanismo antifúngico frente ao *T. mentagrophytes* ATCC 9533 é dependente de PGE<sub>2</sub>;
- O dermatófito, *T. mentagrophytes* ATCC 9533 é produtor da enzima urease;
- A Nimesulida não foi capaz de inibir a produção de urease e consequentemente não diminuiu a viabilidade do *T. mentagrophytes* ATCC 9533;
- O sinergismo entre Terbinafina e Nimesulida ocorreu, no entanto, o índice de FIX mostrou que é uma relação indiferente.
- Os resultados levam a perspectivas futuras de compostos análogos a AINES, modificados a partir de modelagem molecular ou outros métodos, com maior ação antifúngica e menores efeitos adversos.

## 8 REFERÊNCIAS

ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. Dermatophyte virulence factors: identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. ***International Journal of Microbiology***, v. 2012, p. 1-8, 2012.

ALEM, M. A. S., & DOUGLAS, L. J. Effects of Aspirin and Other Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Biofilms and Planktonic Cells of *Candida albicans*. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, v. 48, n. 1, p. 41–47, 2004.

AL-JANABI, A. S. *In vitro* and in vivo therapeutic activity of ibuprofen against dermatophytes. ***Saudi Med Journal***, v. 30, n. 5, p. 624–628, 2009.

\_\_\_\_\_, A.S. Investigation of Anti-Dermatophytic Effects of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on *Trichophyton mentagrophytes* and *Epidermophyton floccosum*. ***Iranian Journal of Pharmaceutical Research***, v.10, n. 3, p. 547-552, 2011.

AL-KURAI SHY, H., ALGAREEB, A., ALWINDY, S. Experimental antibacterial activity of selective cyclooxygenase antagonist. ***International Journal of Basic & Clinical Pharmacology***, v. 2, n. 4, p. 381, 2013.

ALVES, E. G.; Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substancias puras. ***Quim. Nova***, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

AMEEN, M. Epidemiology of superficial fungal infections. ***Clinics in Dermatology***, v. 28, n. 2, p. 197–201.2010.

ANTMAN, E.M. *et al*, Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update for clinicians: a scientific statement from the American heart association. ***Circulation***, v.115, p. 1634-1642, 2007.

ARAI, R., SUGITA, T., NISHIKAWA, A. Reassessment of the *in vitro* synergistic effect of fluconazole with the non-steroidal anti-inflammatory agent ibuprofen against *Candida albicans*. ***Mycosis***, v. 48, p. 38-41, 2005.

ARGENTA, J. S., *et al*. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. ***Antimicrob. Agents Chemother***, v. 52, p. 767–769, 2008.

AVRAM, S., DUDA-SEIMAN, D., SVAB, I., MANCAS, S., DUDA-SEIMAN, C., MIHAILESCU, D. Aspirin and Other Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs as

Cyclooxygenase Inhibitors: State of the Art, Barriers and Perspectives. **Current Computer Aided-Drug Design**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2009.

BHATIA V. K., SHARMA P. C. Epidemiological studies on Dermatophytosis in human patients in Himachal Pradesh, India. **Bhatia and Sharma SpringerPlus**, v. 134, n. 3, p. 2-7, 2014.

BLANCO J.L., GARCIA M.E. Immune response to fungal infections Departamento Sanidad Animal. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, v. 125, p. 47–70, 2008.

BOSSCHE, H.V., MARICHAL, P., ODDS, F.C., JEUNE, L.LE., COENE, M.C. ANTIMICROBLAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. **Division of Medicinal Chemistry and Pharnacology, Janssen Research**, v. 36, n. 12, p. 2602-2610, 1992.

BRILHANTE R.S.N., PAIXÃO G.C., SALVINO L.K., DIÓGENES M.J.N., BANDEIRA S.P., ROCHA M.F.G., ET AL. Epidemiology and ecology of dermatophytoses in the City of Fortaleza: Trichophyton tonsurans as important emerging pathogen of Tinea capitis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, p. 417-25, 2000.

BURKE, A.; SMYTH, E.; FITZ GERALD, G.A. In **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**; Laurence L. Brunton, Ed.; Mc Graw- Hill: New-york. p. 671-717, 2006.

CAFARCHIA, C., IATTA, R., LATROFA, M. S., GRÄSER, Y., OTRANTO, D. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, v. 20, p. 336–351, 2013.

CASTRO, M.; RALSTON, N.V.; MORGENTHALER T.I.; ROHRBACH, M.S.; LIMPER, A.H. *Candida albicans stimulates* arachidonic acid liberation from alveolar macrophages through alpha-mannan and beta-glucan cell wall components. **Infect Immun**, v.62, p. 3138-3145, 1994.

CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungus: approved standad M38-A, Ed. Wayne. **Clinical and laboratory standards institute**, 2008.

CHAHADE, W.H.; GIORGI, R.N.D.; SZAJUBOK, J.C.M. Antiinflamatórios não hormonais. **Einstein**. v.6, n. 1, p. S166-S74, 2008.

CULLEN, L.; KELLY, L.; CONNOR, S.O.; FITZGERALD, D.J. J. Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition by Nimesulide in Man. **The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, v. 287, n.2, p. 578-582, 1998.

CHOWDHURY, B., ADAK, M., & BOSE, S. K. Flurbiprofen, a unique non-steroidal anti-inflammatory drug with antimicrobial activity against Trichophyton, Microsporum

and Epidermophyton species. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, n. 2, p. 158–61, 2003.

DEMEURE, C. E., L.-P. YANG, C. DESJARDINS, P. RAYNAULD, AND G. DELESPESE. Prostaglandin E2 primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines. **Eur. J. Immunol**, v. 27, p. 3526–353, 1997.

DEVA, R.; CICCOLI, R.; SCHEWE, T.; KOCK, J.; NIGAM, S. Arachidonic acid stimulates cell growth, and forms a novel oxygenated metabolite in *Candida albicans*. **Biochim Biophys Acta**, v.1482, p. 299-311, 2000.

DIEGO, A. M. DE. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 29, n. 3, p. 33–39, 2010.

DIXON, D.D; WALSH, T.J. Human Patogenesis. In: BENNET, J.W.; KLICH, M.A. **Aspergillus: biology and industrial application**. Boston: Butterworth.Heinemann, 1992. *Capítulo 11, p. 249-267.*

ELEWSKI, B. E. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 415–29, 1998.

ERB-DOWNWARD, J.R.; HUFFNAGLE, G.B. Role of oxylipins and other lipid mediators in fungal pathogenesis. **Future Microbiol.** v. 1, p. 219-227, 2006.

\_\_\_\_\_; HUFFNAGLE, G.B. *Cryptococcus neoformans* produces authentic prostaglandin E2 without a cyclooxygenase. **Eucaryot Cell**. v. 6, p. 346-350, 2007.

\_\_\_\_\_; NOVEER, M.C. Characterization of prostaglandin E2 production by *Candida albicans*. **Infection and Immunology**, v. 75, n. 7, p. 3498-3505, 2007.

FABIOLA, F. Structural Basis for Selective Inhibition of COX-2 by Nimesulide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 2337–2344, 1998.

FAMAHEY, J. P. Review *In vitro* and in vivo pharmacological evidence of selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide: An overview. **Inflammation Research**, v.46, p. 437–446, 1997.

FELDMAN, M.D. NSAIDs (including aspirin): pathogenesis of gastroduodenal toxicity. Disponível em: <http://www.uptodateonline.com/online/content/search.do>. Acesso em 20 Out. 2014.

FERNÁNDEZ-TORRES, B., JR, M. P., LLOVO, J., OTERO, X. L. Influencia del tiempo de incubación en la determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de la terbinafina frente a *Trichophyton rubrum*. **Rev Iberoan Micol**, p. 290–293, 1998.

FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, Philadelphia, v. 294, n. 5547, p. 1871-1875, nov. 2001.

GHELARDI, E., CELANDRONI, F., GUEYE, S. A., SALVETTI, S., SENESI, S., BULGHERONI, A., & MAILLAND, F. Potential of Ergosterol synthesis inhibitors to cause resistance or cross-resistance in *Trichophyton rubrum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2825–9, May 2014.

GEORGOPAPADAKOU, N. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 547–557, 1998.

GHANNOUM, M. A., RICE, L. B. Antifungal Agents : Mode of Action, Mechanisms of Resistance and Correlation of These Mechanisms with Bacterial **Resistance**. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 82-86, 2003.

\_\_\_\_\_, M. A. Clinical *Trichophyton rubrum* Strain Exhibiting Primary Resistance to Terbinafine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 82–86, 2003.

\_\_\_\_\_, M. A., ARTHINGTON-SKAGGS, B., CHATURVEDI, V., ESPINEL-INGROFF, A, PFALLER, M. A, RENNIE, R., WALSH, T. J. Interlaboratory study of quality control isolates for a broth microdilution method (modified CLSI M38-A) for testing susceptibilities of dermatophytes to antifungals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4353–6, 2006.

GOMEZ-LOPEZ, A., M. CUENCA-ESTRELLA, E. MELLADO, AND J. L. RODRIGUES-TUDELA. *In vitro* evaluation of combination of terbinafine with itraconazole or amphotericin B against Zygomycota. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** V. 45, p. 199–202, 2003

GUPTA, A K., FLECKMAN, P., BARAN, R. Ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of toenail onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 4, p. S70–S80, 2000.

\_\_\_\_\_, Baran, R. Ciclopirox nail lacquer solution 8% in the 21st century. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 4, p. S96–S102, 2000.

\_\_\_\_\_, Ciclopirox combined with pulse terbinafine versus continuous terbinafine for the treatment of moderate to severe dermatophyte toenail onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, p. 123, 2005.

HAMILTON-MILLER, J.M.T. Chemistry and Biology of the Polyene Macrolide Antibiotics. **Bacteriological Reviews**, v. 37, n. 2, p. 166-196, 1973.

HARVEY R.A., CHAMPE P.C., FISHER B.D. **Microbiologia ilustrada**. São Paulo: Artmed; 2008.

HERMAN, R.P.; HERMAN, C.A. Prostaglandins or prostaglandina like substances are implicated in normal growth and development in oomycetes. **Prostaglandins**, v. 29, n. 5, p. 819-830, maio 1985.

HIRUMA, M., KANO R, SUGITA TAKASHI, TAKASHI MOCHIZUKI, ATSUHIKO HASEGAWA, MASATARO HIRUMA. Urease gene of *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii*. **Journal of Dermatology**, v. 40, p. 111–113, 2013.

KANBE, T., SUZUKI, Y., KAMIYA, A., MOCHIZUKI, T. Species-identification of dermatophytes *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes. **Journal of Dermatological Science**, v. 33, p. 41–54, 2003.

KLIPPEL, J.H., WEYDMAN, C.M., WORTMANN, R.L. Primer in the rheumatic diseases. 12 ed. Georgia: editor, **Arthritis Foudation**, p. 700, 2001.

KUIJPERS, A. F. A., PRESBER, W., & GRA, Y. Molecular Taxonomy of the *Trichophyton rubrum*. **Complex**, p. 3329–3336, 2000.

KURTZMAN, C.P.; VESONDER, R.F.; SMILEY, M.J. Formation of 3-D-Hidroxy palmitic acid by *Saccharomycopsis Malanga*. **Mycologia**, v. 56, n. 4, p. 580-587, jul. 1974.

KOCK, J.F.L The distribution of 3-hidroxy oxylipins in fungi. **Prostaglandins 6 Other Lipid Mediators**, v. 71, n. 3-4, p. 85-96, jul 2003.

LANGE M., JASIEL-WALIKOWSKA E., NOWIKI R., BYKOWSKA B. Tinea incognito due to *Trichophyton mentagrophytes*. **Mycoses Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases**, v. 53, p. 455–457, 2009.

LAKSHMIPATHY, D. T., KANNABIRAN, K. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. **Natural Science**, v. 2, n. 7, p. 726–731, 2010.

LARONE H. D. Culture and Identification of Dermatophytes. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 18, n. 5, p. 378-387, 1996.

LEE, I. R., YANG, L., SEBETSO, G., ALLEN, R., DOAN, T. H. N., BLUNDELL, R., ... FRASER, J. A. Characterization of the complete uric acid degradation pathway in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PloS One**, v. 8, n. 5, p. 1-13, 2013

LESHER, J. L. JR. Oral Therapy of common superficial fungal infection of the skin. **Journal of the American academy of dermatology**, v. 40, n. 6, p. 31-34, 1999.

LEYDEN, J. Pharmacokinetics and pharmacology of Terbinafine and Itraconazole. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, n. 5 Part 3, p. S42–7, 1998.

LIU S., HOU Y., CHEN X., GAO Y., LI H., SUN S. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 5, p. 395–402, 2014.

LODEWYK, J.; KOCK, J.; VENTER, P.; BOTHA, A, et al. The production of biologically active eicosanoids by yeasts. **Adv Exp Med Biol**, v.433, p. 217-219, 1997.

LUPETTI, A., DANESI, R., CAMPA, M., TACCA, M. DEL, KELLY, S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 2, p. 76–81, 2002.

MABONA, U., VILJOEN, A., SHIKANGA, E., MARSTON, A., VAN, S. Antimicrobial activity of southern African medicinal plants with dermatological relevance: From an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of a bioactive compound. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 45-55, 2013.

MAHMOUD, A.L.E, SHANAWANY, A.A.E. Factors affecting growth and urease production by *Trichophyton* spp. **Mycopathologia**, v. 135, p. 110-113, 1996.

MAO L., ZHANG A L., HUA LI B.A., CHEN D. W., WANG A. H., WU A. S., GUO A. C., AILING LU A.C., GUIWEN YANG A., LIGUO D., PARIDE ABLIZ, MENGA B. G. Pathogenic Fungus *Microsporium canis* Activates the NLRP3 Inflammasome. **Journals ASM. Org: Infection and Immunity**, v. 82, n. 2, p. 882-892, 2013.

MARPLES J.M. The Ecology Of *Microsporium Canis* Bodin In New Zealand. **Department of Microbiology**, University of Otago, New Zealand, v. 54, n. 3, p. 378–387, 1956.

MARQUES, S. A., ROBLES, A. M., TORTORANO, A. M., TUCULET, M. A., NEGRONI, R., MENDES, R. P., “Mycoses associated with AIDS in the third world,” **Medical Mycology**, v. 38, n. 1, p. 269–279, 2000.

McCOEMACK, B.A.; RHODA W. BENHAM, An unusual finding in *Epidermophyton floccosum*. **The Journal of Investigative Dermatology**, p. 315-317, 1952.

MITCHELL, J. A, AKARASEREENONT, P., THIEMERMANN, C., FLOWER, R. J., VANE, J. R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 24, p. 11693–7, 1994.

MOBLEY, H. L. T., HAUSINGER, R. P. Microbial Ureasas : Significance, Regulation, and Molecular Characterization. **Microbiological Review**, v. 53, n. 1, p. 85–108, 1989.

MONTEIRO, M. C. *et al*; A New Approach to Drug Discovery: High-Throughput Screening of Microbial Natural Extracts against *Aspergillus fumigatus* Using Resazurin. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 17, n. 4, p. 542-549, 2012.

MONTEJANO, H.A. *et al*. The excited-states quenching of resazurin and resorufin by p-benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**, v. 64, p. 117-124, 2005.

MUKHERJEE, P. K., LEIDICH, S. D., ISHAM, N., LEITNER, I., RYDER, N. S., NASERI. A., FATA. A., NAJAFZADEH, M.J., SHOKRI, H. Surveillance of Dermatophytosis in Northeast of Iran (Mashhad ) and Review of Published Studies. **Mycopathologia**, v. 176, p. 247–253, 2013.

NEWLAND, J. G., ABDEL-RAHMAN, S. M. Update on terbinafine with a focus on dermatophytoses. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v.2, p. 49–63, 2009.

NOVERR, M. C., TOEWS, G. B., HUFFNAGLE, G. B. Production of Prostaglandins and Leukotrienes by Pathogenic Fungi. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 1, p. 400–402, 2001.

\_\_\_\_\_, M. C., TOEWS, G. B., HUFFNAGLE, G. B. Production of Prostaglandins and Leukotrienes by Pathogenic Fungi. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 1, p. 400-402, 2002.

\_\_\_\_\_, M. C. ERB-DOWNWARD, J. R., HUFFNAGLE, G. B. Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. **Clin microbial**, v.16, p. 517-533. 2003.

NAKANO, M., DENDA, N., MATSUMOTO, M., KAWAMURA, M., KAWAKUBO, Y., HATANAKA, K., HARADA, Y. Interaction between cyclooxygenase (COX)-1- and COX-2-products modulates COX-2 expression in the late phase of acute inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 559, n. 2-3, p. 210–218, 2007.

NUNES, C., LOPES, D., PINHEIRO, M., PEREIRA-LEITE, C., REIS, S. *In vitro* assessment of NSAIDs-membrane interactions: significance for pharmacological actions. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 8, p. 2097–107, 2013.

ODDS, F. C., BROWN, A. J. P., & GOW, N. A. R. Antifungal agents : mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, 2003.

\_\_\_\_\_, F. C. Review. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 31:p. 463–471, 1993.

OLIVEIRA J.A.A, BARROS J.A., CORTEZ A.C.A., OLIVEIRA J.R.S.L. Superficial mycoses in the City of Manaus/AM between March and November/2003. **An Bras Dermatol.** V. 81, p. 238-43, 2006.

OSTERHOLZER, J.J.; SURANA, R.; MILAN, J.E.; MONTANO, G.T.; CHEN, G.H.; *et al.* Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **Am J Pathol**, v.174, p. 932-943, 2009.

PIRES C.A.A., CRUZ N.F.S., LOBATO A.M., SOUSA P. O. S., CARNEIRO R.F.O., MENDES A.M.D. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis\*. **An Bras Dermatol**, v. 89, p. 2, p. 259-64, 2014.

PETERS-GOLDEN, M. Lipid mediator synthesis by lung macrophages, Lung macrophages and dendritic cells in health and disease. In **M. F. Lipscomb and S. W. Russell**, v. 102, p. 151–182, 1997

PFALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **AJM**, v. 125, n. 1, p. S3–S13, 2012.

QUADROS, A.U., BINI, D., PEREIRA, P.A., MORONI, E.G., MONTEIRO, M.C. Antifungal activity of some cyclooxygenase inhibitors on *Candida albicans*: PGE2-dependent mechanism. **Folia Microbiologica**, v. 56, p. 349-352, 2011.

RASHID, A, SCOTT, E. M., RICHARDSON, M. D.. Inhibitory effect of terbinafine on the invasion of nails by Trichophyton mentagrophytes. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 33, n. 5, p. 718–23.1995.

RAZA ALY. Ecology and epidemiology of dermatophyte infections. **Am Acad Dermatol**, v. 31, p. S21-S25, 1994.

RHODS, J.C.; BODE, R.B.; MCCUAN-KIRSCH, C.M.; Elastase production in clinical isolates of Aspergillus. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, v. 10, n. 3, p. 165-170, jul 1998.

RIPPON, J. W. The pathogenic fungi and pathogenic Actinomycetes. **Medical mycology**, v. 178, 1998.

RODRIGUES, M., CAMARGO, D., MARTINS, C., FERNANDA, T., FRAGA-SILVA, D. C., CAROLINA, A., ARRUDA, P. DE. Dermatophyte e host relationship of a murine model of experimental invasive dermatophytosis. **Microbes and Infections**, v. 14, p. 1144–1151, 2012.

RUTHERFORD, J. C. The emerging role of urease as a general microbial virulence factor. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 5, p. 1-3, 2014.

RYDER, N. S. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. **Br. J. Dermatol**, v. 126, n. 39, p. 2–7, 1992.

SANYAL, A.K. and BANERJEE, A.B. Urease Activity in Trichophyton mentagrophytes. **Folia Microbiol**, v. 28, p. 82-86, 1983.

SCOTT, E. M., TARIQ, V. N., & MCCRORY, R. M. Demonstration of synergy with fluconazole and either ibuprofen, sodium salicylate, or propylparaben against *Candida albicans* *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2610–2614, 1995.

SEEBACHER C., BOUCHARA J.P., MIGNON B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**, v. 166, p. 335-52, 2008.

SIQUEIRA E.R., FERREIRA J.C., MAFFEI C. M. L., CANDIDO R. C. Occurrence of dermatophyte, in nails, feet and hands of university students. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 3, p. 269-71, 2006.

SMEEKENS, S. P., VAN DE VEERDONK, F. L., VAN DER MEER, J. W. M., KULLBERG, B. J., JOOSTEN, L. A B., & NETEA, M. G. The *Candida* Th17 response is dependent on mannan- and beta-glucan-induced prostaglandin E2. **International Immunology**, v. 22, n. 11, p. 889–895, 2010.

SMITH, P. T.; DOUGLAS, A.K.J.; GOODMAN, N. Isolation and characterization of urease from *Aspergillus niger*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, n. 5, p. 957-962, maio 1993.

SOLOMON, D.H. NSAIDs: mechanism of action, jun 2007. Disponível em: <http://www.uptodateonline.com/online/content/search.do>. Acesso em 22 Nov. 2014.

STODOLA FH, DEINEMA MH, SPENCER JFT. Extracellular lipids. **Bact Rev**, v. 31, p. 194–213, 1967.

SULEYMAN, H., CADIRCI, A. ALBAYARAK, HALICI, Z., Nimesulida is a Selective COX-2 Inhibitory, Atypical Non-Steroidal Anti- Inflammatory Drug. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 278-283, 2008.

\_\_\_\_\_, H.; GUL, H.I.; ASOGLU, M. Anti-inflammatory activity of 3-benzoyl-1-methyl-4-phenyl-4-piperidinol hydrochloride. **Pharmacological Research**, v. 47, n. 6, p. 471-475, 2003.

SUMMERBELL, R.C.; ROSENTHAL, S.A.; KANE, J. Rapid method for differentiation of *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* related dermatophyte species. **J Clin Microbiol**, v. 26, p. 2279-2282, 1988.

TAMURA, T., ASAHARA, M., YAMAMOTO, M., YAMAURA, M., MATSUMURA, M., GOTO, K., MAKIMURA, K. *In vitro* susceptibility of dermatomycoses agents to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index of combined effects of amorolfine and itraconazole in dermatophytes. **Microbiology and Immunology**, v. 58, n. 1, p. 1–8, 2014.

TEIXERA, N., PERES, D. A., ROSSI, A., MARTINEZ-ROSSI, N. M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifungos. **An Bras Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657–667, 2010.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. Rio de Janeiro: 8 ed., Atheneu, 2008.

TSITSIGIANNIS, D. I., BOK, J., ANDES, D., NIELSEN, K. F., FRISVAD, J. C., KELLER, N. P. *Aspergillus* Cyclooxygenase-Like Enzymes Are Associated with Prostaglandin Production and Virulence. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 4548-4559, 2005.

URIBE MP, CARDONA-CASTRO N. Mecanismos de adherencia e invasión de dermatofitos a la piel. **Rev CES Med**, v. 27, n. 1, p. 67-75, 2013.

VAN VUUREN, S. F., VILJOEN, A. M. *In vitro* evidence of phyto-synergy for plant part combinations of *Croton gratissimus* (Euphorbiaceae) used in African traditional healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 700–4, 2008.

WEIG, M. FRANK-MICHAEL C. MULLER. Synergism of Voriconazole and Terbinafine against *Candida albicans* Isolates from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Oropharyngeal Candidiasis. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 45, N. 3, p. 966–968. 2001.

YU, J., L. RUOYU, M. ZHANG, L. LIU, AND Z. WAN. 2008. *In vitro* interactions of Terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblastomycosis in China. **Med. Mycol**, v. 4, p. 745–747.

ZHANG, A. Y., CAMP, W. L., ELEWSKI, B. E. Advances in Topical and Systemic Antifungals. **Dermatologic Clinics**, v. 25, p. 165–183, 2007.

ZIMMER *et al.* Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clinic. **Revista Liberato**, Nova Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 123-137, jul/dez. 2009.