

UNIVERSIDADE PAULISTA

**FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Nannizzia gypsea*
ISOLADAS DE SOLO DE PARQUES DO
MUNICÍPIO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

MARILIA ALARCON NOGUEIRA

São Paulo
2021

UNIVERSIDADE PAULISTA

**FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Nannizzia gypsea*
ISOLADAS DE SOLO DE PARQUES DO
MUNICÍPIO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob a orientação da prof.^a Dr.^a Selene Dall’Acqua Coutinho.

MARILIA ALARCON NOGUEIRA

São Paulo

2021

Nogueira, Marília Alarcon.

Fatores de virulência de *Nannizzia gypsea* isoladas de solo de parques do Município de São Paulo / Marília Alarcon Nogueira. - 2021.

46 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Selene Dall'Acqua Coutinho.

1. Dermatofitos geofílicos. 2. Dermatofitose. 3. Enzimas.
4. Hemolisinas. I. Coutinho, Selene Dall'Acqua (orientadora).
II. Título.

MARILIA ALARCON NOGUEIRA
FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Nannizzia gypsea*
ISOLADAS DE SOLO DE PARQUES DO
MUNICÍPIO DE SÃO PAULO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____ / ____ / _____

Prof. Dra. Selene Dall' Acqua Coutinho
Universidade Paulista – UNIP

_____ / ____ / _____

Prof. Dr. Alexandre Lourenço
Universidade Paulista – UNIP

_____ / ____ / _____

Profa. Dra. Paula Andréa de Santis Bastos
Universidade Metropolitana de Santos – UNIMES

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que me auxiliaram a chegar ao fim desta jornada. Destino-o a cada animal que passou e passará por mim durante a minha trajetória na medicina veterinária.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora Profa. Dra. Selene Dall' Acqua Coutinho, que me auxiliou a todo momento, me ensinou e me aconselhou de forma sábia, tranquila e com muito respeito, a senhora me inspirou a ser uma profissional melhor.

Agradeço à minha família que me apoiou, me incentivou e me deu toda a estrutura para concluir mais uma etapa profissional.

Agradeço também a toda equipe do HOVET – UNIP, por serem os primeiros a me apoiarem e me permitirem dar mais este passo para o meu desenvolvimento, obrigada a cada um de vocês.

Agradeço a Instituição Unip, que virou minha segunda casa e tenho muito orgulho de fazer parte.

Por fim agradeço a cada docente e funcionário do Programa de Pós-graduação de Patologia da UNIP, que me ensinaram muito e foram sempre solícitos a qualquer necessidade minha.

Sem todos vocês nada disso seria possível, obrigada do fundo do meu coração.

ΕΠΪΓΡΑΦΕ

*“All our dreams can come true, if we have the courage to pursue them”
(Walt Disney)*

RESUMO

Por sua característica zoonótica, a dermatofitose tem grande importância para a saúde pública. Particularmente, os dermatófitos geofílicos são insuficientemente estudados por serem considerados estritamente oportunistas; entretanto, *Nannizzia gypsea* (sin. *Microsporium gypseum*), que é geofílica, tem sido isolada por todo o mundo causando infecções no homem e animais, confirmando o potencial patogênico que os fungos geofílicos apresentam. O sucesso no estabelecimento da infecção pelos dermatófitos depende de várias proteínas e enzimas fúngicas, que são a chave na invasão e utilização do estrato córneo do hospedeiro; portanto, o estudo dos fatores de virulência envolvidos na patogenicidade desses fungos auxiliará na compreensão da epidemiologia das dermatofitoses. O objetivo do presente estudo foi pesquisar a secreção de hemolisinas e das enzimas proteinase, fosfolipase, lipase e gelatinase em cepas de *N. gypsea*. Foram testadas 21 cepas de *N. gypsea* isoladas do solo de 21 parques do município de São Paulo pela técnica de Vanbreuseghem. A produção das enzimas fosfolipase, proteinase e lipase foi verificada empregando-se placas de Petri com meio sólido contendo o respectivo substrato a ser degradado, respectivamente, gema de ovo, albumina sérica bovina e Tween 20. O teste foi considerado positivo quando ocorreu uma zona clara de degradação ao redor da colônia. Para a verificação da produção da enzima gelatinase foi empregado meio contendo gelatina, o qual foi distribuído em tubos; a semeadura ocorreu em picada e antes da leitura final, os tubos foram refrigerados a 4° C por 30 minutos. O teste foi considerado positivo quando houve liquefação do meio. Na prova da produção de hemolisinas empregou-se base de ágar sangue suplementada com 5% de sangue de carneiro desfibrinado; nesta prova, após a leitura de 14 dias, as placas foram incubadas a 32° C. Em cada um dos testes, após a semeadura, as placas foram incubadas por 14 dias a 25° C, realizando-se leituras aos 5, 7, 10 e 14 dias. Todas as 21 cepas de *N. gypsea* produziram fosfolipase aos 14 dias, gelatinase, a partir de 10 dias, proteinase e lipase, a partir de 7 dias de incubação. Em relação à fosfolipase, a maioria das reações foi fortemente positiva para a produção da enzima. Aos 14 dias a 32° C, se verificou hemólise em 81,0% (17/21) das cepas, sendo 82,4% (14/17) de α -hemólise (hemólises parciais) e 17,6% (3/17) de β -hemólise (hemólise total). Uma das cepas produziu ambas α - e β -hemólise. Todas as cepas de *N. gypsea* testadas produziram enzimas e/ou hemolisinas, consideradas fatores de virulência, revelando

seu potencial de patogenicidade. Os intervalos de leitura ideais para a produção das enzimas fosfolipase, proteinase, lipase e gelatinase foram, respectivamente, 14, 7, 7 e 10 dias; em relação à atividade hemolítica sugere-se 14 dias com temperatura de 32° C. A presença de *N. gypsea*, com a produção de fatores de virulência em solos de parques do município de São Paulo, pode representar potencial risco de infecção aos humanos e animais que usufruem desses espaços dedicados ao lazer.

Palavras-chave: Dermatófitos geofílicos; dermatofitose; enzimas; hemolisinas.

ABSTRACT

Dermatophytosis is of significant importance for public health because of its zoonotic characteristic. In particular, geophilic dermatophytes have been insufficiently studied because they are considered strictly opportunistic. However, cases of infections due to *Nannizzia gypsea* (syn. *Microsporium gypseum*), a geophilic dermatophyte, in both humans and animals have been found globally, confirming the pathogenic potential of geophilic fungi. Dermatophytoses caused by these fungi is attributed to several proteins and enzymes produced by them and also the use of the host's stratum corneum by the fungi. Therefore, the study of virulence factors of these fungi will be helpful in understanding the epidemiology of dermatophytoses. The aim of this study was to investigate the secretion of hemolysins, proteinase, phospholipase, lipase, and gelatinase enzymes by *N. gypsea* strains. Twenty-one strains of *N. gypsea* isolated using the Vanbreuseghem technique from the soil samples of 21 parks in São Paulo, Brazil, were tested. The production of phospholipase, proteinase, and lipase was verified by culturing these strains in Petri dishes containing a solid culture medium. This medium contained the respective substrate for degradation such as egg yolk, bovine serum albumin, and Tween 20. The test was considered positive when there was a clear area of degradation around the colony. To check the production of gelatinase, a medium containing gelatin was used that was distributed in tubes and punctiform inoculation was performed. Before the final reading, the tubes were refrigerated at 4° C for 30 min. The test was considered positive when there was a liquefaction of the medium. In the hemolysin production test, blood agar base supplemented with 5% defibrinated sheep blood was used. In this test, after reading for 14 days, the plates were incubated at 32° C. In each of these tests, after inoculation, the plates were incubated for 14 days at 25° C, with readings taken at 5, 7, 10, and 14 days. All the 21 strains of *N. gypsea* produced phospholipase at 14 days, gelatinase from 10 days, and proteinase and lipase from 7 days of incubation. Most of the reactions were strongly positive for the production of phospholipase. At 14 days at 32° C, hemolysis was observed in 81.0% (17/21) of the strains, with α -hemolysis (partial hemolysis) in 82.4% (14/17) of the strains and β -hemolysis (complete hemolysis) in 17.6% (3/17) of the strains. One of the strains produced both α - and β -hemolysis. All the strains of *N. gypsea* produced enzymes and/or hemolysins, which are considered virulence factors, thus revealing their pathogenic potential. The ideal reading intervals

for detecting the production of phospholipase, proteinase, lipase, and gelatinase were 14, 7, 7, and 10 days respectively. For detecting hemolytic activity, 14 days at a temperature of 32° C is recommended. The presence of virulent strains of *N. gypsea* in the soils of parks in São Paulo may represent a potential risk of infection to humans and animals that enjoy these spaces for leisure.

Key-words: geophilic dermatophytes; dermatophytosis; enzymes; hemolysins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização de 21 parques recreativos pesquisados no município de São Paulo.....	22
Figura 2 – Precipitado ao redor de colônia de <i>N. gypsea</i> isolada de solo de parque do município de São Paulo, pela produção de fosfolipase aos 10 dias de incubação. ..	25
Figura 3 – Halo claro ao redor de colônia de <i>N. gypsea</i> isolada de solo de parque do município de São Paulo, pela produção de proteinase aos 7 dias de incubação.....	25
Figura 4 – Halo claro ao redor de colônia de <i>N. gypsea</i> , isolada de solo de parque do município de São Paulo, pela produção de lipase aos 7 dias de incubação.	28
Figura 5 - Liquefação do meio de cultura por <i>Nannizzia gypsea</i> isolada de solo de parque do município de São Paulo, pela produção de gelatinase aos 10 dias de incubação.:.....	28
Figura 6 - Presença de hemólise parcial (α -hemólise) (A) e total (β -hemólise) (B) por <i>Nannizzia gypsea</i> isoladas de solo de parques do município de São Paulo aos 14 dias de incubação a 32° C.	31
Figura 7 - Presença de hemólise dupla (α e β) por <i>Nannizzia gypsea</i> isolada de solo de parque do município de São Paulo aos 14 dias de incubação a 32° C.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de fosfolipase por cepas de <i>Nannizzia gypsea</i> isoladas do solo de 21 parques do município de São Paulo aos 5, 7, 10 e 14 dias de incubação.	26
Tabela 2 - Produção de proteinase por cepas de <i>Nannizzia gypsea</i> isoladas do solo de 21 parques do município de São Paulo aos 5, 7, 10 e 14 dias de incubação.	27
Tabela 3 - Produção de lipase por cepas de <i>Nannizzia gypsea</i> isoladas do solo de 21 parques do município de São Paulo aos 5, 7, 10 e 14 dias de incubação.	29
Tabela 4 - Produção de gelatinase por cepas de <i>Nannizzia gypsea</i> isoladas do solo de 21 parques do município de São Paulo aos 5, 7, 10 e 14 dias de incubação.	30
Tabela 5 - Atividade hemolítica de cepas de <i>Nannizzia gypsea</i> isoladas do solo de 21 parques do município de São Paulo aos 5, 7, 10 e 14 dias de incubação.	32
Tabela 6 - Produção de fosfolipase, proteinase, lipase, gelatinase e hemolisina por cepas de <i>Nannizzia gypsea</i> isoladas do solo de 21 parques do município de São Paulo.	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Cepas de <i>Nannizzia gypsea</i>	22
3.2	Pesquisa da produção de enzimas.....	22
3.2.1	Fosfolipase	22
3.2.2	Proteinase	23
3.2.3	Lipase	23
3.2.4	Gelatinase	23
3.3	Pesquisa de atividade hemolítica	24
3.4	Análise de dados	24
4	RESULTADOS	25
5	DISCUSSÃO.....	34
6	CONCLUSÕES.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

Os dermatófitos são fungos pertencentes à família *Arthrodermataceae*, filamentosos, queratinofílicos e queratinolíticos e tradicionalmente eram divididos em três gêneros, *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (de HOOG et al., 2005). Porém, em 2017, se estabeleceu uma nova taxonomia dos dermatófitos, não se baseando apenas na análise fenotípica para sua classificação; desta forma, foram encontradas diferenças no genoma das espécies pela biologia molecular, sendo necessário reclassificar e criar novos gêneros: *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Arthroderma*, *Nannizzia*, *Paraphyton* e *Lophophyton* (de HOOG et al., 2017). Dentre as alterações ocorridas, verificou-se que a antiga espécie *Microsporum gypseum* foi realocada em novo gênero, sendo denominada de *Nannizzia gypsea* (sin. *Microsporum gypseum*) (DUKIK et al., 2020).

Os dermatófitos são responsáveis pela infecção fúngica mais frequente no mundo, afetando 20 a 25% da população mundial (ZHAN; LIU, 2017) e causando infecções tanto em humanos, como em animais (HAYETTE; SACHELI, 2015; LANA et al., 2016; MARTINEZ-ROSSI et al., 2017; GRÄSER et al., 2018). Estes fungos têm habilidade de invadir tecidos como pele, pelos e unhas e outras estruturas queratinizadas, e por sua característica queratinolítica, podem usar a queratina como substrato energético e nutricional (NENOFF et al., 2013; LANA et al., 2016; GRÄSER et al., 2018).

Existem fatores não biológicos que também influenciam a replicação desses fungos como a temperatura, a luz, umidade, clima, quantidade de matéria orgânica disponível e o pH (PONTES et al., 2013; SEGAL; FRENKEL, 2015).

A dermatofitose é distribuída por todo o mundo (ZHAN; LUI, 2017). Essa distribuição é variável dependendo das condições geográficas e climáticas de cada região, e de outros fatores como migrações de pessoas e animais (HAYETTE; SACHELI, 2015). O meio rural é referido como o mais propenso a ter casos de infecções por dermatófitos, devido maior contato com os animais de produção e o solo (SEGAL; FRENKEL, 2015); porém, tem aumentado o número de infecções causadas por animais de companhia, graças ao contato estreito que esses mantêm com as pessoas (NEVES et al., 2018).

Na Europa, *T. rubrum* é a espécie mais prevalente seguida de *M. canis*, sendo responsáveis principalmente pelo desenvolvimento de *tinea pedis* e onicomicoses (SEGAL; FRENKEL, 2015; HAYETTE; SACHELI, 2015). Nos Estados Unidos e na América Central, os agentes mais comuns são *T. tonsurans* e *T. rubrum*, causando principalmente *tinea capitis* (SEGAL; FRENKEL, 2015; ZHAN; LIU, 2017).

Na Ásia, os agentes mais comuns são *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* (BALAKUMAR et al., 2012; HAYETTE; SACHELI, 2015) e *M. canis* (ZHAN; LUI, 2017) causando geralmente *tinea capitis*.

Na África, as dermatofitoses são muito frequentes, embora subdiagnosticadas e, por consequência, não tratadas (HAYETTE; SACHELI, 2015). No homem, a forma mais prevalente é a *tinea capitis* e as principais espécies são *M. audouinii*, *T. tonsurans*, *T. soudanense*, *T. rubrum* e *T. violaceum* (NGWOGU; OTOKUEFOR, 2007; HAYETTE; SACHELI, 2015; COULIBALY et al., 2017).

No Brasil os dermatófitos causadores de dermatofitoses responsáveis por *tinea capitis* são *M. canis* e *T. tonsurans*, acometendo crianças, e em menor frequência, adolescentes e adultos (BERGSON; FERNANDES 2001; BRILHANTE et al., 2004). Segundo Lana e colaboradores (2016), além dessas espécies, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *T. interdigitale* também apresentam alta prevalência no país.

É importante ressaltar que as migrações promovem maior disseminação de diferentes espécies de dermatófitos; além disso, a relação homem e animal, fatores ecológicos, socioeconômicos e terapêuticos também refletem na maior expansão dos dermatófitos pelo mundo (SEGAL; FRENKEL, 2015; ZHAN; LIU, 2017).

As espécies de dermatófitos se dividem em três grupos, classificados de acordo com seu habitat e são denominados zoofílicos, sendo seu reservatório os animais, antropofílicos, o reservatório é o ser humano e os geofílicos, no qual seu reservatório é o solo (de HOOG et al., 2017). Entretanto, estes habitats não são exclusivos, podendo os dermatófitos geofílicos infectar homens e animais (LANA et al., 2016; GARCÍA-AGUDO; ESPINOZA-RUIZ, 2018; GRÄSER et al., 2018).

As principais espécies zoofílicas são *M. canis* e *T. mentagrophytes*; as antropofílicas são *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. soudanense* e *M. audouinii* e *Nannizzia gypsea* (*M. gypseum*) é o principal dermatófito geofílico responsável por infecções (GARCÍA-MARTOS et al., 2004; AMEEN, 2010; MADRID et al., 2012; HAYETTE; SACHELI, 2015; SEGAL; FRENKEL, 2015; SOUZA et al., 2016).

Os animais podem carrear os dermatófitos e transmiti-los aos humanos; portanto, as dermatofitoses são zoonoses de importância em Saúde Pública (MORETTI et al., 2013; TORRES-GUERRERO et al., 2016; COULIBALY et al., 2017). Esta transmissão pode ocorrer por contato direto com pelos ou escamas de pele, ou contato indireto com fômites contaminados (BERALDO et al., 2011; SEGAL; FRENKEL, 2015; TORRES-GUERRERO et al., 2016; NEVES et al., 2018). Além disso, os animais podem ser portadores assintomáticos dos dermatófitos (BERALDO et al., 2011; FRAGA et al., 2017).

Crianças e indivíduos imunocomprometidos apresentam maior susceptibilidade às dermatofitoses (ABARCA et al., 2011; NENOFF et al., 2013; MARTINEZ-ROSSI et al., 2017). Pacientes com distúrbios hematológicos, linfedema, psoríase, *diabetes mellitus*, portadores de HIV e lúpus eritematoso, dentre outros, têm maiores chances de desenvolver a doença (MACÊDO et al., 2008; NENOFF et al., 2013; GRÄSER et al., 2018). Além disso, constatou-se que em famílias com consanguinidade, mesmo os imunocompetentes desenvolveram dermatofitose (GRÄSER et al., 2018).

Existe correlação de dermatofitose em crianças e pacientes imunocomprometidos que mantêm contato direto com animais domésticos (ABARCA et al., 2011). Entretanto, outros benefícios são acrescidos na vida desses pacientes com o contato com esses animais, considerando-se que a maioria das dermatofitoses acometem tecidos superficiais, os benefícios trazidos geralmente são maiores que os prejuízos (ABARCA et al., 2011).

A interação entre os dermatófitos e seus hospedeiros envolve complexos mecanismos moleculares, ainda não compreendidos perfeitamente. O arsenal fúngico utilizado para colonizar os tecidos do hospedeiro compreende moléculas de superfície responsáveis pela adesão. As adesinas, são moléculas expressas na parede celular fúngica que permitem a rápida adesão aos tecidos do hospedeiro e matriz extracelular (MARTINEZ-ROSSI et al., 2017). Para alguns dermatófitos se mostrou que carboidratos encontrados na superfície da pele do hospedeiro, como manose e galactose, são necessários para que ocorra a adesão, além da secreção de proteases pelos fungos (CHINNAPUN, 2015), como subtilisina 3, que está envolvida no processo de adesão de *M. canis* ao tecido cutâneo (BALDO et al., 2010; MARTINEZ-ROSSI et al., 2017).

Os dermatófitos, quando entram em contato com a epiderme, aderem ao tecido queratinizado do hospedeiro e a germinação do antroconídio possibilita que a hifa

penetre no estrato córneo (NENOFF et al., 2013; CHINNAPUN, 2015; MARTINEZ-ROSSI et al., 2017). A aderência dos dermatófitos ocorre em 3-4 horas e a germinação em 24 horas (BALDO et al., 2010). O sucesso no estabelecimento da infecção é dependente de várias proteínas e enzimas reguladas por múltiplos genes, que são ativados ou reprimidos em resposta ao microambiente dos tecidos do hospedeiro (MARTINEZ-ROSSI et al., 2017).

Diversos fatores são importantes para a multiplicação do fungo, sendo a produção de endo e exoproteases proteolíticas responsável por promover a degradação de proteínas em aminoácidos e peptídeos assimiláveis, os quais são utilizados como nutrientes para o microrganismo (BALDO et al., 2010; SRIRANGANADANE et al., 2011; TARABEES et al., 2015; GRÄSER et al., 2018).

Os fungos secretam múltiplas serinaproteases, as subtilisinas (Sub) e metaloproteases, as fungalisinas (Mep), genericamente chamadas de queratinases (MONOD, 2008; VERMOUT et al., 2008a; TARABEES et al., 2015). Tecidos queratinizados não são compostos só de queratina, mas de uma rede insolúvel de proteínas interligadas, que formam a camada celular cornificada (MONOD, 2008). As proteases secretadas são incapazes, por si só, de degradar o compacto tecido queratinizado, há necessidade prévia de quebra das pontes de dissulfeto da cisteína encontradas na queratina; uma vez que os dermatófitos durante a infecção excretam sulfito este atuará como agente redutor (MONOD, 2008). Assim, as proteínas reduzidas tornam-se acessíveis para a hidrólise pelas proteases secretadas. As endoproteases (Sub e Mep) são responsáveis pela clivagem das proteínas e produzem um elevado número de peptídeos com terminais C ou N, que possibilitam a ativação das exoproteases, promovendo assim um sinergismo que permite a degradação da queratina pelos dermatófitos (MONOD, 2008; LEMSADDEK et al., 2010).

Os mecanismos de expressão dos genes de virulência dos dermatófitos são pouco conhecidos, mas aventa-se que a ativação dos genes seja controlada por alteração nas fontes de nitrogênio que ocorre quando o microrganismo está no hospedeiro (VERMOUT et al., 2008a; MARTINEZ-ROSSI et al., 2017). Os genes que regulam a produção de proteases são MEP 1, MEP 2, MEP 3, MEP 4 e MEP 5, para as fungalisinas e SUB1, SUB 2, SUB 3, SUB 4, SUB 5, SUB 6 e SUB 7, para as subtilisinas (MONOD, 2008), sendo os principais MEP 3 e SUB 3. O MEP 3 é responsável pela atividade queratinolítica, elastinolítica e colagenolítica, e o SUB 3

está envolvido na aderência do antroconídio nos corneócitos (BROUTA et al., 2002; VERMOUT et al., 2008a; LEMSADDEK et al., 2010; TARABEES et al., 2015).

Durante o crescimento, vários genes fúngicos que codificam proteínas são ativados (BRASCH, 2010). As numerosas enzimas liberadas permitem, não só a degradação e utilização da queratina como fonte nutricional, mas também a utilização de outras proteínas e lipídeos (BRASCH, 2010). A secreção de enzimas, como queratinase, proteinase, fosfolipase, lipase e elastase, dentre outras, garante a sobrevivência do microrganismo quando ocorre a interação do patógeno com as linhas de defesa inata e adquirida do hospedeiro (NENOFF et al., 2013; CHINNAPUN, 2015; MARTINEZ-ROSSI et al., 2017). Os fatores de virulência dos dermatófitos contribuem para a modulação da resposta imune do hospedeiro, sendo particularmente consideradas as glicoproteínas da parede celular e as enzimas secretadas (CRIADO et al., 2011; GNAT et al., 2018).

A habilidade dos microrganismos patogênicos adquirir ferro é de suma importância em sua sobrevivência e estabelecimento da infecção. Desde que não há ferro livre no hospedeiro humano, muitos patógenos adquirem indiretamente de compostos que contêm ferro, como a hemoglobina (NAYAK et al., 2013). Os patógenos destroem o heme e extraem o elemento ferro e as enzimas envolvidas nessa atividade são as hemolisinas (NAYAK et al., 2013). As hemolisinas têm efeito tóxico nas membranas dos eritrócitos e para as células do sistema imunológico inato do hospedeiro, portanto prejudicam a resposta imune, diminuindo suas defesas contra os fungos (NAYAK et al., 2013; AKTAS; YIGIT, 2015; ELAVARASHI et al., 2017). Embora bastante estudadas em bactérias, pouco se conhece sobre a produção de hemolisinas por fungos, particularmente por dermatófitos; contudo, são consideradas fatores de virulência potenciais (NAYAK et al., 2013).

Os sinais clínicos das dermatofitoses variam dependendo da região, da espécie que está provocando a lesão e da condição imunológica do hospedeiro. Geralmente as infecções causadas por dermatófitos geofílicos e zoofílicos produzem uma grande reação inflamatória em humanos (de HOOG et al., 2017; MARTINEZ-ROSSI et al., 2017). As lesões variam de formas localizadas descamativas, que podem evoluir para eritematosas, com presença de alopecia e inflamação (LANA et al., 2016).

Normalmente, as lesões em animais se apresentam como áreas de alopecia, descamação, crostas, eritemas e não são pruriginosas; podendo ser circulares, únicas ou múltiplas e raramente simétricas (CHERMETTE et al., 2008; BOND, 2010;

MORETTI et al., 2013). Quando o prurido está presente, pode estar associado a infecções bacterianas secundárias (CHERMETTE et al., 2008; BOND, 2010). Em animais imunocompetentes, as lesões podem ser autolimitantes e, algumas vezes, são assintomáticos, sendo apenas considerados carreadores do fungo (CHERMETTE et al., 2008; GRÄSER et al., 2018; TORRES-GUERRERO et al., 2016).

Para realizar o diagnóstico dessas infecções, deve ser considerado o histórico do paciente, as manifestações clínicas e utilizar algumas técnicas diagnósticas disponíveis atualmente, como exame direto das escamas de pele e pelos, cultura fúngica e análise fenotípica dos isolados, histopatológico e identificação molecular por PCR (reação em cadeia da polimerase) (GOMES et al., 2012; HAYETTE; SACHELI, 2015; PIHET; Le GOVIC, 2017).

No exame microbiológico, se promovem colheitas de áreas lesionadas (cabelos, unhas, pelos), realizando-se um raspado de pele na borda da lesão e o tracionamento de pelos ou cabelos (CHERMETTE et al., 2008; GOMES et al., 2012; PIHET; Le GOVIC, 2017). As amostras clínicas são cultivadas geralmente em ágar Sabouraud dextrose, incubadas em temperatura de 25° a 28° C e as colônias isoladas são identificadas por características macro e micromorfológicas, analisando-se as estruturas reprodutivas (GOMES et al., 2012; PIHET; Le GOVIC, 2017).

A realização de biópsias e exame histopatológico deve ser considerada principalmente quando se trata de onicomicoses (PIHET; Le GOVIC, 2017). A PCR tem sido usada basicamente em pesquisa e institutos de referência, não sendo muito empregada para o diagnóstico na rotina clínica. Embora se saiba que esta técnica é mais eficiente para o diagnóstico, comparando-se com o exame direto e a cultura, ela é mais onerosa, necessita de equipamentos especiais e pessoal treinado para a sua realização (GOMES et al., 2012; PIHET; Le GOVIC, 2017; GNAT et al., 2019).

Como as lesões provocadas por estes fungos são confundíveis com outras doenças, é de suma importância a realização de diagnóstico diferencial com outras afecções, como *alopecia areata*, dermatite seborreica, psoríase e piodermites (GARCÍA-AGUDO; ESPINOSA-RUIZ, 2018).

O tratamento preconizado é a combinação de medicamentos tópicos e orais; tanto em humanos como em animais, devendo-se considerar a espécie de dermatófito, o local da lesão e sua extensão (CHERMETTE et al., 2008; LANA et al., 2016; GARCÍA-AGUDO; ESPINOSA-RUIZ, 2018; GNAT et al., 2019). O tratamento promove a cura, além de evitar que os doentes e portadores assintomáticos infectem

outros animais/humanos e contaminem o meio ambiente (CHERMETTE et al., 2008; NEVES et al., 2018).

De forma geral, cita-se na literatura, como uso tópico, cetoconazol, miconazol, isoconazol, clotrimazol, terbinafina e ciclopirox olamina. Em uso sistêmico são utilizados griseofulvina, terbinafina, cetoconazol, miconazol e itraconazol (CHERMETTE et al., 2008; LANA et al., 2016; GARCÍA-AGUDO; ESPINOSA-RUIZ, 2018; GNAT et al., 2019). A duração do tratamento é extremamente importante, a fim de evitar resistência ao fármaco ou recidivas, este só deve ser suspenso após se obter duas culturas negativas seguidas (CHERMETTE et al., 2008). Segundo García-Agudo e Espinosa-Ruiz (2018), o uso de prednisona pode ser indicado para diminuir a inflamação e tentar evitar a perda definitiva dos cabelos em humanos.

Particularmente, os dermatófitos geofílicos têm sido insuficientemente estudados, ao se pensar no grande número de hospedeiros potenciais animais (de HOOG et al., 2017). Muitas vezes as espécies geofílicas não são consideradas nos painéis de identificação dos dermatófitos das infecções humanas, porque se aceitam somente as espécies antropofílicas como patógenos reais e as geofílicas são consideradas oportunistas (de HOOG et al., 2005). Entretanto, *N. gypsea*, que é geofílica, tem sido isolada em todo o mundo causando infecções no homem (GARCÍA-MARTOS et al., 2004; IORIO et al., 2007; COULIBALY et al., 2017; GARCÍA-AGUDO; ESPINOZA-RUIZ, 2018) e animais (COPETTI et al., 2006; IORIO et al., 2007; MADRID et al., 2012; NARDONI et al., 2013; TORRES-GUERRERO et al., 2016).

Em levantamento sobre a epidemiologia das dermatofitoses na África se verificou que *N. gypsea* foi agente de *tinea capitis* e *tinea corporis* em diferentes países, África do Sul, Nigéria e Tunísia (COULIBALY et al., 2017).

Na Espanha em um estudo de 133 casos de infecção causada por dermatófitos, *N. gypsea* correspondeu a 6% do total de isolados (GARCÍA-MARTOS et al., 2004). Ainda, na Espanha, ocorreu relato de caso de *tinea capitis* por *N. gypsea* em criança em 2018 (GARCÍA-AGUDO; ESPINOZA-RUIZ, 2018).

Em cães e gatos, embora em menor proporção do que *M. canis*, *N. gypsea* também é responsável por casos de dermatofitose (IORIO et al., 2007; NARDONI et al., 2013; TORRES-GUERRERO et al., 2016).

No Brasil, esta espécie tem sido relatada em infecções humanas (DIAS et al., 2003; BRILHANTE et al., 2004; SOUZA et al., 2016) e animais (COPETTI et al., 2006; BERALDO et al., 2011; MADRID et al., 2012; NEVES et al., 2018). Em 2012, foi

documentado surto de dermatofitose neonatal envolvendo sete filhotes da espécie canina (MADRID et al., 2012). Em estudo sobre a disseminação dos dermatófitos no ambiente domiciliar, isolou-se *N. gypsea* de dois cães e de fômites no interior das residências (NEVES et al., 2018). Em relação aos casos no homem, *N.gypsea* correspondeu a 3% de *tinea capitis* em crianças em Goiânia (DIAS et al., 2003) e foi isolada de quatro crianças com dermatopatias em Porto Alegre, sendo que duas delas relataram contato com o solo (areia) (SOUZA et al., 2016).

Todos esses relatos confirmam o potencial patogênico que os fungos geofílicos apresentam, em especial *N. gypsea*. Entretanto, pouco se sabe sobre seus fatores de virulência, em particular, a produção de enzimas e hemolisinas.

O sucesso no estabelecimento da infecção pelos dermatófitos depende de várias proteínas e enzimas fúngicas, que são a chave na invasão e utilização do estrato córneo do hospedeiro; portanto, o estudo dos fatores de virulência envolvidos na patogenicidade desses fungos auxiliará na compreensão da epidemiologia e seu papel no desenvolvimento das dermatofitoses (CHINNAPUN, 2015; MARTINEZ-ROSSI et al., 2017).

Em pesquisa prévia do grupo, *N. gypsea* foi isolada do solo de diversos parques do município de São Paulo, aventando-se para o risco que estes fungos poderiam representar para a população (CARRER, 2018); contudo, seus possíveis fatores de virulência não foram pesquisados.

2 OBJETIVOS

Padronizar as técnicas e pesquisar fatores de virulência, hemolisinas e enzimas, por *N. gypsea* isoladas do solo de parques do município de São Paulo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas de *Nannizzia gypsea*

Foram testadas 21 cepas de *N. gypsea* isoladas do solo pela técnica de Vanbreuseghem e caracterizadas em estudo prévio, provenientes de 21 parques recreativos de diferentes regiões do município de São Paulo (Figura 1) (CARRER, 2018).

Figura 1 - Localização de 21 parques recreativos pesquisados no município de São Paulo.



Fonte: Adaptação de figura disponível em <http://cetsp.com.br>. Acesso em: 27.02.2020.

3.2 Pesquisa da produção de enzimas

3.2.1 Fosfolipase

O meio de ágar Sabouraud dextrose (Mikrobiologie-Merck, Darmstadt, Germany) (65,0 g/L) contendo cloreto de sódio 1 M e cloreto de cálcio 0,005 M foi autoclavado e resfriado a 45-50° C. Gema de ovo caipira a 8% foi adicionada,

homogeneizando-se com cuidado, a fim de prevenir a formação de bolhas e então distribuído em placas, as quais foram incubadas em estufa BOD por 14 dias a 25° C, realizando-se leituras aos 5, 7, 10 e 14 dias. Foi considerada prova positiva para a produção de fosfolipase, quando ocorreu a formação de um precipitado claro ao redor da colônia (PRICE et al., 1982).

3.2.2 Proteinase

O meio *Yeast Carbon Base* (Sigma, Steinheim, Germany) (11,7 g/L) foi acrescido de ágar (Sigma, Steinheim, Germany) (18,0 g/L) e autoclavado. Foi preparada solução estéril de albumina sérica bovina (Sigma, Steinheim, Germany) (2,0 g/L) e Protovit (Boehringer Ingelheim do Brasil, Itapeceira da Serra, Brasil) (2,0 mL/L) por filtração em membrana Milipore de 22 µm (Millex® Merck-Tulagreen, Carrigtwohill, Ireland). Esta solução foi adicionada ao meio básico quando este atingiu 45-50° C. Após a semeadura, as placas foram incubadas em estufa BOD a 25° C durante 14 dias, realizando-se leituras aos 5, 7, 10 e 14 dias e a formação de halo claro ao redor da colônia indicou a produção de proteinase (RÜCHEL et al., 1982).

3.2.3 Lipase

As amostras foram inoculadas em placas contendo 10,0 g de peptona (Mikrobiologie-Merck, Darmstadt, Germany), 5,0 g de cloreto de sódio, 0,1 g de cloreto de cálcio, 20,0 g de ágar (Sigma, Steinheim, Germany) e 10,0 mL de *Tween* 20 (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil) em 1.000 mL de água destilada. O meio foi autoclavado e após a semeadura, as placas foram incubadas em estufa BOD por 14 dias a 25° C, realizando-se leituras aos 5, 7, 10 e 14 dias e o teste considerado positivo quando ocorreu uma zona clara ao redor da colônia (CAFARCHIA et al., 2011).

3.2.4 Gelatinase

Foi empregado meio contendo peptona (Mikrobiologie-Merck, Darmstadt, Germany) (5 g/L), extrato de carne (Mikrobiologie-Merck, Darmstadt, Germany) (3 g/L)

e gelatina (Mikrobiologie-Merck, Darmstadt, Germany) (120 g/L), o qual foi distribuído em tubos (5 mL por tubo), autoclavado e os tubos resfriados “em pé”. A sementeira foi em picada e os tubos incubados em estufa BOD a 25° C por 14 dias, realizando-se leituras aos 5, 7, 10 e 14 dias. Antes da leitura final os tubos foram refrigerados a 4° C por 30 minutos. O teste foi considerado positivo quando houve liquefação do meio (ELAVARASHI et al., 2017).

3.3 Pesquisa de atividade hemolítica

Foi empregada a base de ágar sangue (Columbia Blood Agar Base, Acumedia-Neogen, Lansing, USA) suplementada com 5% de sangue de carneiro desfibrinado (Laborclin, Curitiba, Brasil), o qual foi acrescido ao ágar quando este atingiu a temperatura de 45-50° C. Um pequeno fragmento da colônia de *N. gypsea* foi suspenso em solução fisiológica 0,9% e uma alçada da suspensão de esporos foi inoculada no centro da placa, sendo esta incubada em estufa BOD por 14 dias a 25° C. As placas foram então incubadas a 32° C para aumentar a atividade enzimática e uma zona clara ao redor da colônia indicou prova positiva. As leituras foram realizadas aos 5, 7, 10 e 14 dias (AKTAS; YIGIT, 2015).

3.4 Análise de dados

As atividades enzimáticas dos testes de proteinase, fosfolipase e lipase foram expressas como a razão do diâmetro total da colônia sobre o diâmetro total da colônia mais a zona de precipitação/degradação, considerando-se:

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{\text{Diâmetro da colônia}}{\text{Diâmetro da colônia+zona de precipitação}}$$

1,0 = negativo (índice 1)

<1,0 e ≥0,64 = positivo (índice 2)

<0,64 = fortemente positivo (índice 3) (PRICE et al., 1982).

A eventual associação entre as variáveis perfil de resultado e tempo de incubação foi avaliada por meio do teste de chi quadrado de independência, com significância de 95%, considerando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

A enzima fosfolipase foi produzida por 90,5% (19/21) das cepas aos 10 dias de leitura, com índices fortemente positivos em 57,1% (12/21) delas. Aos 14 dias todas as cepas produziram esta enzima (Tabela 1 e Figura 2). A positividade das reações se deu, sobretudo, após 10 dias (significante em relação aos períodos anteriores), não alterando significativamente o perfil de resultados, caso o período de incubação seja estendido até 14 dias.

Figura 2 – Precipitado ao redor de colônia de *N. gypsea* isolada de solo de parque do município de São Paulo, pela produção de fosfolipase aos 10 dias de incubação.



Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto à enzima proteinase, 95% (20/21) das cepas produziram aos 5 dias de leitura e todas a partir dos 7 dias (Tabela 2 e Figura 3). Após 5 dias de incubação, não ocorreu alteração significativa no perfil de resultados, caso fosse estendido até 14 dias (Figura 03) e nos intervalos de 10 e 14 dias as leituras tornaram-se mais difusas.

Figura 3 – Halo claro ao redor de colônia de *N. gypsea* isolada de solo de parque do município de São Paulo, pela produção de proteinase aos 7 dias de incubação.



Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 1 - Produção de fosfolipase por cepas de *Nannizzia gypsea* isoladas do solo de 21 parques do município de São Paulo aos 5, 7, 10 e 14 dias de incubação.

Parques	5 dias		7 dias		10 dias		14 dias	
	Razão*	Índice	Razão	Índice	Razão	Índice	Razão	Índice
1	1,00	1	1,00	1	1,00	1	0,64	2
2	1,00	1	1,00	1	1,00	1	0,56	3
3	1,00	1	1,00	1	0,54	3	0,68	2
4	1,00	1	1,00	1	0,57	3	0,63	3
5	1,00	1	1,00	1	0,84	2	0,52	3
6	0,75	2	0,62	3	0,84	2	0,73	2
7	1,00	1	1,00	1	0,54	3	0,57	3
8	1,00	1	1,00	1	0,78	2	0,81	2
9	1,00	1	0,91	2	0,77	2	0,66	2
10	1,00	1	1,00	1	0,43	3	0,53	3
11	1,00	1	1,00	1	0,72	2	0,63	3
12	1,00	1	1,00	1	0,62	3	0,46	3
13	0,66	2	0,56	3	0,50	3	0,63	3
14	1,00	1	1,00	1	0,73	2	0,66	2
15	1,00	1	1,00	1	0,66	2	0,70	2
16	1,00	1	1,00	1	0,31	3	0,64	2
17	1,00	1	1,00	1	0,63	3	0,54	3
18	1,00	1	1,00	1	0,59	3	0,47	3
19	1,00	1	1,00	1	0,56	3	0,57	3
20	0,84	2	0,77	2	0,50	3	0,38	3
21	1,00	1	1,00	1	0,26	3	0,34	3
Média	0,96		0,95		0,64		0,56	

$$*Razão = \frac{\text{Diâmetro da colônia}}{\text{Diâmetro da colônia+zona de degradação}}$$

Índice = 1,0 – negativo (índice 1)

< 1,0 e ≥ 0,64 – positivo (índice 2)

< 0,64 – fortemente positivo (índice 3)

Tabela 2 - Produção de proteinase por cepas de *Nannizzia gypsea* isoladas do solo de 21 parques do município de São Paulo aos 5, 7, 10 e 14 dias de incubação.

Parques	5 dias		7 dias		10 dias		14 dias	
	Razão*	Índice	Razão	Índice	Razão	Índice	Razão	Índice
1	0,80	2	0,87	2	0,75	2	0,90	2
2	0,90	2	0,75	2	0,68	2	0,93	2
3	0,90	2	0,83	2	0,96	2	0,86	2
4	0,80	2	0,75	2	0,93	2	0,91	2
5	0,85	2	0,82	2	0,93	2	0,92	2
6	0,69	2	0,84	2	0,84	2	0,91	2
7	0,60	3	0,73	2	0,77	2	0,86	2
8	0,89	2	0,89	2	0,93	2	0,89	2
9	0,42	3	0,66	2	0,64	2	0,88	2
10	0,72	2	0,66	2	0,93	2	0,89	2
11	0,91	2	0,84	2	0,76	2	0,86	2
12	0,90	2	0,87	2	0,88	2	0,88	2
13	0,84	2	0,84	2	0,84	2	0,92	2
14	0,77	2	0,76	2	0,88	2	0,92	2
15	0,52	3	0,50	3	0,82	2	0,83	2
16	1,00	1	0,71	2	0,71	2	0,80	2
17	0,85	2	0,85	2	0,85	2	0,84	2
18	0,81	2	0,77	2	0,75	2	0,90	2
19	0,69	2	0,82	2	0,82	2	0,87	2
20	0,53	3	0,70	2	0,85	2	0,88	2
21	0,75	2	0,76	2	0,83	2	0,87	2
Média	0,77		0,77		0,83		0,88	

$$*Razão = \frac{\text{Diâmetro da colônia}}{\text{Diâmetro da colônia+zona de degradação}}$$

Índice = 1,0 – negativo (índice 1)

< 1,0 e ≥ 0,64 – positivo (índice 2)

< 0,64 – fortemente positivo (índice 3)

A produção da enzima lipase ocorreu, sobretudo, a partir dos 7 dias, não alterando significativamente o perfil de resultados, caso o período de incubação fosse estendido (Figura 4 e Tabela 3); entretanto, as leituras de casos fortemente positivos se tornaram dificultadas, caso a leitura se prolongasse até os 14 dias.

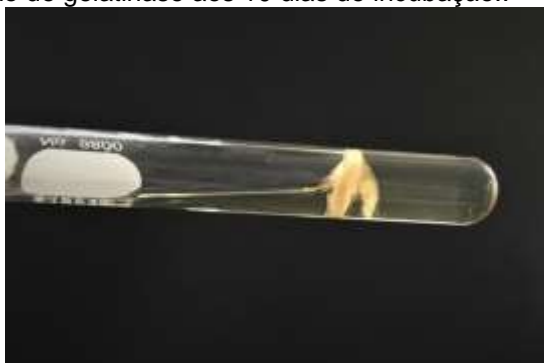
Figura 4 – Halo claro ao redor de colônia de *N. gypsea*, isolada de solo de parque do município de São Paulo, pela produção de lipase aos 7 dias de incubação.



Fonte: Arquivo pessoal.

A positividade para a produção da enzima gelatinase pode ser observada em 57,1% (12/21) das cepas aos 7 dias, mas com algumas reações fracas. A partir dos 10 dias, todas as reações tornaram-se positivas e com fácil visualização (Figura 5 e Tabela 4).

Figura 5 - Liquefação do meio de cultura por *Nannizzia gypsea* isolada de solo de parque do município de São Paulo, pela produção de gelatinase aos 10 dias de incubação.:



Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 3 - Produção de lipase por cepas de *Nannizzia gypsea* isoladas do solo de 21 parques do município de São Paulo aos 5, 7, 10 e 14 dias de incubação.

Parques	5 dias		7 dias		10 dias		14 dias	
	Razão*	Índice	Razão	Índice	Razão	Índice	Razão	Índice
1	1,00	1	0,88	2	0,85	2	0,86	2
2	1,00	1	0,90	2	0,93	2	1,00	1
3	1,00	1	0,78	2	0,81	2	0,82	2
4	1,00	1	0,90	2	0,89	2	0,92	2
5	1,00	1	0,85	2	0,84	2	0,80	2
6	1,00	1	0,52	3	0,60	3	0,78	2
7	1,00	1	0,65	2	0,81	2	0,81	2
8	1,00	1	0,71	2	0,80	2	0,79	2
9	1,00	1	0,85	2	0,79	2	0,79	2
10	1,00	1	0,83	2	0,77	2	0,87	2
11	1,00	1	0,30	3	0,57	3	0,81	2
12	1,00	1	0,85	2	0,79	2	0,80	2
13	1,00	1	0,90	2	0,87	2	0,82	2
14	1,00	1	0,82	2	0,83	2	0,87	2
15	1,00	1	0,51	3	0,73	2	0,69	2
16	1,00	1	0,75	2	0,65	2	0,86	2
17	1,00	1	0,89	2	0,88	2	0,87	2
18	1,00	1	0,72	2	0,78	2	0,84	2
19	0,78	2	0,80	2	0,64	2	0,85	2
20	1,00	1	0,64	2	0,78	2	0,84	2
21	1,00	1	0,63	3	0,72	2	0,78	2
Média	0,99		0,75		0,77		0,83	

$$*Razão = \frac{\text{Diâmetro da colônia}}{\text{Diâmetro da colônia} + \text{zona de degradação}}$$

Índice= 1,0 – negativo (índice 1)

< 1,0 e ≥ 0,64 – positivo (índice 2)

< 0,64 – fortemente positivo (índice 3)

Tabela 4 - Produção de gelatinase por cepas de *Nannizzia gypsea* isoladas do solo de 21 parques do município de São Paulo aos 5, 7, 10 e 14 dias de incubação.

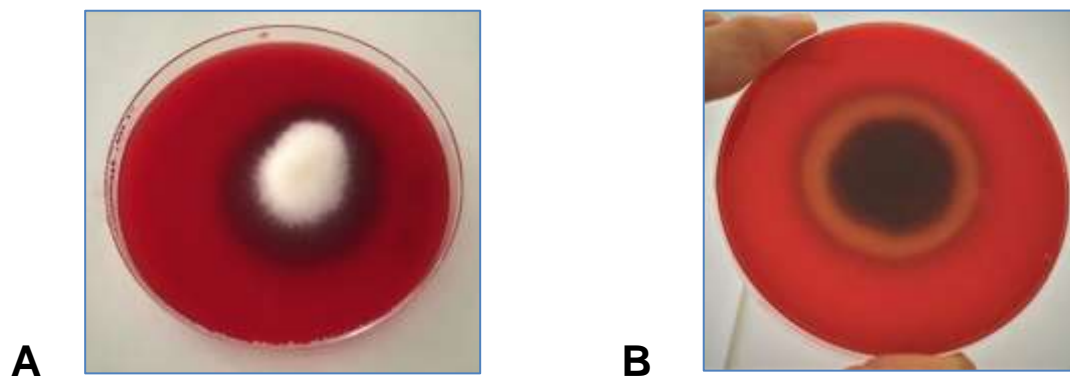
Parques	5 dias	7 dias	10 dias	14 dias
1	+	+	+	+
2	-	-	+	+
3	-	+	+	+
4	-	+	+	+
5	-	-	+	+
6	-	-	+	+
7	-	-	+	+
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+
10	-	+	+	+
11	-	-	+	+
12	-	+	+	+
13	-	+	+	+
14	-	-	+	+
15	+	+	+	+
16	-	-	+	+
17	-	+	+	+
18	-	-	+	+
19	-	-	+	+
20	-	+	+	+
21	+	+	+	+

+ Reação positiva; - Reação negativa

Quanto à atividade hemolítica, as cepas iniciaram hemólise aos 10 dias a 25° C, mas ao se comparar os tempos de 10 dias e 14 dias (25° C ou 32° C), notou-se maior taxa de atividade hemolítica apenas quando a temperatura de incubação foi elevada. Na temperatura de 32° C aos 14 dias se verificou hemólise em 81,0% (17/21) das cepas, sendo 82,4% (14/17) delas parciais (α) e 17,6% (3/17) de hemólise total

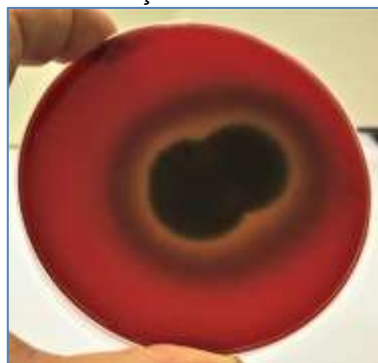
(β) (Figura 6 e Tabela 5). Também se observou cepa que apresentou concomitantemente hemólise parcial e total (Figura 7).

Figura 6 - Presença de hemólise parcial (α -hemólise) (A) e total (β -hemólise) (B) por *Nannizzia gypsea* isoladas de solo de parques do município de São Paulo aos 14 dias de incubação a 32° C.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 7 - Presença de hemólise dupla (α e β) por *Nannizzia gypsea* isolada de solo de parque do município de São Paulo aos 14 dias de incubação a 32° C.



Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 5 - Atividade hemolítica de cepas de *Nannizzia gypsea* isoladas do solo de 21 parques do município de São Paulo aos 5, 7, 10 e 14 dias de incubação.

Parques	5 dias	7 dias	10 dias	14 dias	
				25° C	32° C
1	-	-	-	α-hemólise	α-hemólise
2	-	-	α-hemólise	α-hemólise	α-hemólise
3	-	-	-	-	α-hemólise
4	-	-	-	α-hemólise	α-hemólise
5	-	-	-	α-hemólise	α-hemólise
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	α-hemólise	α-hemólise	α-hemólise
9	-	-	β-hemólise	β-hemólise	β-hemólise
10	-	-	-	-	-
11	-	-	α-hemólise	α/β-hemólise	α/β-hemólise
12	-	-	-	α-hemólise	α-hemólise
13	-	-	-	-	α-hemólise
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	α-hemólise
16	-	-	α-hemólise	α-hemólise	α-hemólise
17	-	-	-	α-hemólise	α-hemólise
18	-	-	β-hemólise	β-hemólise	β-hemólise
19	-	-	α-hemólise	-	α-hemólise
20	-	-	α-hemólise	α-hemólise	α-hemólise
21	-	-	α-hemólise	α-hemólise	α-hemólise

α = Hemólise parcial; β = Hemólise total; - Ausência de hemólise

Na tabela 6 se tem um quadro geral do comportamento de cada uma das cepas de *N. gypsea* frente às diferentes enzimas e hemolisinas pesquisadas.

Tabela 6 - Produção de fosfolipase, proteinase, lipase, gelatinase e hemolisina por cepas de *Nannizzia gypsea* isoladas do solo de 21 parques do município de São Paulo.

Parques	Fosfolipase		Proteinase		Lipase		Gelatinase	Hemólise
	14 dias		7 dias		7 dias		10 dias	14 dias
	Razão*	Índice	Razão*	Índice	Razão*	Índice		32° C
1	0,64	2	0,87	2	0,88	2	+	α-hemólise
2	0,56	3	0,75	2	0,90	2	+	α-hemólise
3	0,68	2	0,83	2	0,78	2	+	α-hemólise
4	0,63	3	0,75	2	0,90	2	+	α-hemólise
5	0,52	3	0,82	2	0,85	2	+	α-hemólise
6	0,73	2	0,84	2	0,52	3	+	-
7	0,57	3	0,73	2	0,65	2	+	-
8	0,81	2	0,89	2	0,71	2	+	α-hemólise
9	0,66	2	0,66	2	0,85	2	+	β-hemólise
10	0,53	3	0,66	2	0,83	2	+	-
11	0,63	3	0,84	2	0,30	3	+	α/β-hemólise
12	0,46	3	0,87	2	0,85	2	+	α-hemólise
13	0,63	3	0,84	2	0,90	2	+	α-hemólise
14	0,66	2	0,76	2	0,82	2	+	-
15	0,70	2	0,50	3	0,51	3	+	α-hemólise
16	0,64	2	0,71	2	0,75	2	+	α-hemólise
17	0,54	3	0,85	2	0,89	2	+	α-hemólise
18	0,47	3	0,77	2	0,72	2	+	β-hemólise
19	0,57	3	0,82	2	0,80	2	+	α-hemólise
20	0,38	3	0,70	2	0,64	2	+	α-hemólise
21	0,34	3	0,76	2	0,63	3	+	α-hemólise

α = hemólise parcial; β = hemólise total; - ausência de hemólise; + produção de gelatinase

*Razão = $\frac{\text{Diâmetro da colônia}}{\text{Diâmetro da colônia+zona de degradação}}$
Índice = 1,0 – negativo (índice 1)
< 1,0 e ≥ 0,64 – positivo (índice 2)
< 0,64 – fortemente positivo (índice 3)

5 DISCUSSÃO

Várias enzimas fúngicas secretadas pelos dermatófitos participam da resposta adaptativa ao ambiente e na degradação da queratina (MARTINEZ-ROSSI et al., 2017), as quais garantem sua adesão, penetração, nutrição e modulam a resposta imunológica do hospedeiro, sendo essas enzimas consideradas fatores importantes para desencadear a doença (CHINNAPUN, 2015; GNAT et al., 2018).

Os fosfolípedes são constituintes essenciais da camada bilaminar das membranas celulares e auxiliam na manutenção da forma e integridade das células (BARMAN et al., 2018). As fosfolipases são uma superfamília de enzimas que catalisam a hidrólise dos fosfolípedes da membrana (BARMAN et al., 2018). Elas constituem algumas das principais enzimas produzidas pelos dermatófitos durante a infecção, pois são responsáveis por hidrolisar os fosfolípedes em ácidos graxos e outras substâncias lipofílicas, facilitando o processo de infecção por conseguirem romper a camada superficial da pele, favorecendo sua colonização (ELAVARASHI et al., 2017; SIQUEIRA, 2008).

Nesta pesquisa, todas as 21 cepas produziram fosfolipase, a maioria apresentando índices fortemente positivos aos 14 dias de leitura, indicando potencial de virulência da *N. gypsea*. Os melhores intervalos de leitura foram aos 10 e 14 dias; entretanto, indica-se 14 dias como padrão, pois neste intervalo todas as cepas produziram a enzima. Outros pesquisadores verificaram a ocorrência de atividade de fosfolipase em espécies de dermatófitos, como *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum* (ELAVARASHI et al., 2017), *T. verrucosum* e *T. benhamiae* (LAGOWSKI et al., 2020). Gnat e colaboradores (2018) observaram a produção de fosfolipase em 96% de dermatófitos isolados de animais com e sem dermatofitose; contudo, *N. gypsea* não foi pesquisada. Verificou-se a secreção de fosfolipase por *N. gypsea* isolada de cão no Recife (TORRES et al., 2018) e também de cepa-padrão (ELAVARASHI et al., 2017); entretanto, apenas uma cepa testada em cada trabalho.

As proteases ou proteinases são um grande grupo de enzimas que hidrolisam ligações peptídicas de proteínas em aminoácidos e peptídeos, sendo encontradas em todos os organismos vivos e são essenciais no crescimento e diferenciação celular (SOUZA et al., 2015). As proteinases secretadas pelos dermatófitos desempenham papel importante na fase inicial da invasão no hospedeiro, por permitir a degradação

das proteínas da barreira epitelial, assimilar e utilizar esse substrato em sua nutrição e crescimento (YIKE, 2011; GRÄSER et al., 2018).

As proteinases são as principais enzimas envolvidas no processo de adesão e penetração dos dermatófitos no tecido queratinizado (CHINNAPUN, 2015). Para a sobrevivência e o crescimento dos dermatófitos em um hospedeiro, eles têm de coordenar a expressão de suas numerosas proteases secretadas, o que é pelo menos em parte, induzido por uma restrição de nutrientes assimiláveis (VERMOUT et al., 2008b).

Na pesquisa aqui relatada, apenas uma cepa de *N. gypsea* não apresentou a produção de proteinase aos cinco dias de incubação e a partir dos sete dias, todas produziram esta enzima; por este motivo, sugere-se que sua leitura seja fixada em 7 dias, pois em intervalos superiores os halos tornaram-se mais difusos, dificultando as leituras.

Assim como em relação à fosfolipase, diversas espécies de dermatófitos têm sido referidas como produtoras de proteinases; entretanto, poucos são os artigos e o número de amostras testadas para a produção desta enzima por *N. gypsea*. Quanto ao referido na literatura, três cepas de *N. gypsea* produziram a enzima (MUHSIN et al., 1997; ELAVARASHI et al., 2017; TORRES et al., 2018); contudo, as amostras foram coletadas de animais e não do solo.

Microsporum canis isolados de cães e gatos com dermatofitose (TORRES et al., 2018) e cepas-padrão de *M. canis* apresentaram a produção de proteinase (ELAVARASHI et al., 2017), assim como as espécies *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (ELAVARASHI et al., 2017). Em estudo sobre a produção de proteinase por diferentes espécies dos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton floccosum*, verificou-se a produção da enzima em 79% das cepas analisadas, relacionando à penetração nos tecidos do hospedeiro (GNAT et al., 2018).

A camada queratinizada da epiderme, que pode ser colonizada pelos dermatófitos, é coberta por lipídeos em sua superfície. A atividade lipolítica dos dermatófitos pode ser de particular importância nos estágios iniciais da infecção, garantindo a sobrevivência desses fungos antes que ocorra sua penetração em camadas mais profundas da epiderme e seu contato com a queratina. Assim, os dermatófitos utilizam os lipídeos como fontes primárias de carbono, antes de penetrarem nas camadas mais ricas em proteínas da epiderme (HELLGREN; VINCENT, 1980; VERMOUT et al., 2008b).

Neste estudo, todas as cepas testadas de *N. gypsea* apresentaram a produção de lipase já aos sete dias de leitura, após a incubação, indicando-se este como o melhor intervalo, pois nas leituras de 10 e 14 dias ocorreu, assim como em relação à proteinase, difusão dos halos e dificuldade nas medidas destes. Em acordo com o verificado, outros pesquisadores também observaram a produção de lipase por *N. gypsea*, conquanto poucas amostras do fungo tenham sido testadas (MUHSIN et al., 1997; ELAVARASHI et al., 2017; TORRES et al., 2018). Dukik e colaboradores na caracterização do gênero *Nannizzia* (DUKIK et al., 2020) testaram 10 cepas de *N. gypsea*, verificando que 90% (9/10) delas produziram lipase. Entretanto, quando amostras de *M. canis* foram testadas para a produção de lipase, os resultados obtidos foram controversos, com alguns autores relacionando sua produção com o estado de doença (CAFARCHIA et al., 2011) e outros detectando a atividade de lipase tanto em cepas isoladas de animais sintomáticos, como em assintomáticos (VIANI et al., 2001; GNAT et al., 2018).

A organização macromolecular e a estabilidade bioquímica da membrana basal são determinadas principalmente pela rede de colágeno tipo IV (MONACO et al., 2006). As gelatinases são as enzimas responsáveis pela digestão do colágeno tipo IV e a fibronectina; portanto, o mecanismo proteolítico dessas estruturas é importante para penetração dos microrganismos nos tecidos (MONACO et al., 2006). Constatou-se que quanto maior a atividade desta enzima, mais severa é a infecção (SIQUEIRA, 2008).

Neste estudo todas as amostras isoladas de *N. gypsea* produziram a enzima gelatinase aos 10 dias de incubação, indicando-se este como o intervalo ideal de leitura. Quando testado por outros pesquisadores, *N. gypsea* mostrou produção desta enzima, embora apenas duas cepas tenham sido experimentadas (MUHSIN et al., 1997; ELAVARASHI et al., 2017). Diversas outras espécies dos gêneros *Microsporium* e *Trichophyton* têm a capacidade de produzir gelatinase e espécies dos complexos *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* apresentaram forte produção da enzima (ELAVARASHI et al., 2017).

O sistema imunológico do hospedeiro impede os dermatófitos de invadirem e causarem doença em camadas mais profundas da pele, pela participação das respostas celular e humoral (VERMOUT et al., 2008b; CRIADO et al., 2011). As reações imunológicas do hospedeiro aos produtos metabólicos dos fungos consistem na migração de linfócitos, neutrófilos, macrófagos e mastócitos na pele (VERMOUT et

al., 2008b; CRIADO et al., 2011); entretanto, à semelhança do que ocorre para as bactérias, alguns fungos também têm a capacidade de produzir hemolisinas, que são citotóxicas para as membranas dos eritrócitos e das células de defesa, deprimindo as respostas do sistema imunológico do hospedeiro (VERMOUT et al., 2008b; NAYAK et al., 2013) Segundo Mendes e colaboradores (2021), a ausência de atividade hemolítica na patogenicidade de infecções fúngicas pode indicar avirulência.

Na pesquisa aqui relatada, 17,6% (3/17) das cepas de *N. gypsea* promoveram hemólise total (β) e grande parte, atividade hemolítica parcial (α) (82,4% - 14/17), o que permite aventar para o potencial de patogenicidade desses fungos, uma vez que os níveis de atividade hemolítica em dermatófitos são correlacionados com a severidade ou cronicidade das infecções clínicas (NAYAK et al., 2013). Diferentemente do observado por Aktas e Yigit (2015), a incubação na temperatura mais elevada que 25° C promoveu aumento da atividade hemolítica e a tornou mais evidente, indicando-se que a leitura seja feita aos 14 dias sob incubação de 32° C. Também difere do observado neste projeto a verificação de 13 cepas de *N. gypsea*, isoladas do solo, apresentar atividade hemolítica total em temperatura de 25° C (MENDES et al., 2021), No estudo do gênero *Nannizzia*, com 10 cepas de *N. gypsea* não se detectou hemólise, contudo o número de cepas era pequeno e os pesquisadores consideraram a prova positiva apenas se houvesse hemólise total (DUKIK et al., 2020).

Nesta pesquisa, uma das amostras de *N. gypsea* apresentou concomitantemente os dois tipos de hemólise (α e β), o que já foi verificado em cepas de algumas espécies de *Trichophyton* (SCHAUFUSS; STELLER, 2003; GNAT et al., 2018). Em relação ao gênero *Trichophyton*, se tem verificado a presença de hemolisinas em diferentes espécies, com intensidades de produção também variáveis, sendo encontrados halos de hemólises completas seguidos de halos de hemólises incompletas, dependendo da espécie estudada (AKTAS; YIGIT, 2017; ELAVARASHI et al., 2017; GNAT et al., 2018; MENDES; et al., 2021), mas sempre se relacionando as hemolisinas com os fatores de virulência desses fungos.

Nesta pesquisa, optou-se por padronizar os melhores intervalos e temperatura de incubação para *N. gypsea*, pois os estudos realizados pesquisando os fatores de virulência dos dermatófitos baseiam-se no comportamento daqueles considerados patogênicos para homens e animais, como *M. canis* e *T. mentagrophytes* (CAFARCHIA et al., 2011; AKTAS; YIGIT, 2015; ELAVARASHI et al., 2017), não

havendo metodologia adequada à *N. gypsea*. Nesses estudos, foram indicados intervalos de leitura que variaram de duas (CAFARCHIA et al., 2011; GNAT et al., 2018) a três semanas (LAGOWSKI et al., 2020; TORRES et al., 2018), o que diferiu do verificado neste trabalho para as enzimas pesquisadas, inclusive a leitura da produção de algumas delas se tornou dificultada nos intervalos indicados pela literatura disponível.

Quase a totalidade das cepas de *N. gypsea*, neste projeto, produziu as enzimas e hemolisinas pesquisadas, ou seja, apresentaram diferentes fatores de virulência, revelando seu potencial de patogenicidade. O cotejamento dos resultados obtidos se mostrou particularmente difícil, pois são poucas as pesquisas analisando os fatores de virulência de *N. gypsea*, por ser considerado microrganismo sapróbio, “de pouca importância na etiologia das dermatofitoses”.

Conquanto o habitat primário dos dermatófitos geofílicos seja o solo, podem infectar e causar doença em homens, animais domésticos e selvagens. Com prevalência variando de 2 a 6%, *N. gypsea* tem sido responsável por casos de dermatofitoses nos homens, principalmente em crianças (NWEZE, 2001; DIAS et al., 2003; GARCIA-MARTOS et al., 2004; IORIO et al., 2007; SOUZA et al., 2016), talvez por terem maior contato com a terra/areia. Em cães e gatos a prevalência de infecções por esta espécie é superior, variando de 9 a 15% (BALDA et al., 2004; IORIO et al., 2007; NARDONI et al., 2013; TORRES-GUERRERO et al., 2016), mas podendo representar 30,8% dos dermatófitos isolados de cães (COPETTI et al., 2006). Espécies geofílicas, como *N. gypsea*, são isoladas com frequência de animais selvagens com dermatofitose; acredita-se que tal ocorra porque os animais selvagens mantêm estreito contato com o solo, reservatório das espécies geofílicas (COUTINHO, 2014).

A biota fúngica das infecções superficiais variou geográfica e historicamente nos últimos 100 anos, estando em permanente mudança no mundo. A mobilidade das populações, drogas antifúngicas e o estilo de vida influenciam continuamente a evolução dos dermatófitos no microambiente da pele (ZHAN; LIU, 2017), tornando microrganismos, outrora desconsiderados, como agentes também de dermatofitoses.

No município de São Paulo é prática comum buscar o lazer em parques, possibilitando a interação meio ambiente-homem-animais. Sabendo-se que os dermatófitos são fungos oportunistas (GRÄSER et al., 2018), as pessoas, e particularmente as crianças e animais que têm contato maior com o solo, estão

sujeitos a adquirir dermatofitose por agentes geofílicos, como os pesquisados neste estudo.

A presença de *N. gypsea*, com a produção de fatores de virulência em solos de parques do município de São Paulo, representa potencial risco de infecção aos humanos e animais que usufruem desses espaços dedicados ao lazer.

6 CONCLUSÕES

Todas as cepas de *N. gypsea* testadas produziram enzimas e/ou hemolisinas, consideradas fatores de virulência, revelando seu potencial de patogenicidade.

Os intervalos de leitura ideais para a produção das enzimas fosfolipase, proteinase, lipase e gelatinase foram, respectivamente, 14, 7, 7 e 10 dias; em relação à atividade hemolítica sugere-se 14 dias com temperatura de 32 ° C.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, V. A. K.; LÓPEZ, P. J.; PEÑA, D. A.; LÓPEZ, G. C. Tenencia y estado de salud de mascotas de niños inmunocomprometidos, con énfasis en enfermedades zoonóticas. **Revista Chilena de Infectología**, v. 28, p. 205-210, 2011.
- AKTAS, E.; YIGIT, N. Hemolytic activity of dermatophytes species isolated from clinical specimens. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, p. 25-30, 2015.
- AMEEN, M. M. D. Epidemiology of superficial fungal infections. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 197-201, 2010.
- BALAKUMAR, S.; RAJAN, S.; THIRUNALASUNDARI, T.; JEEVA, S. Epidemiology of dermatophytosis in and around Tiruchirapalli, Tamilnadu, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. 286-289, 2012.
- BALDA, A.C.; LARSSON, C.E.; OTSUKA, M.; GAMBALE, W. Estudo retrospectivo de casuística das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 133-140, 2004.
- BALDO, A.; MATHY, A.; TABART, J.; CAMPONOVA, P.; VERMOUT, S.; MASSART, L.; MARÉCHAL, M.; GALLEN, M.; MIGNON, B. Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporum canis* is required for adherence but not for invasion of the epidermis. **Clinical and Laboratory Investigations**, v. 162, p. 990-997, 2010.
- BARMAN, A.; GOHAIN, D.; BORA, U.; TAMUL, R. Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual development, and virulence in fungi. **Microbiological Research**, v. 209, p. 55-69, 2018.
- BERALDO, R. M.; GASPAROTO, A. K.; SIQUEIRA, A. M.; DIAS, A. L. T. Dermatophytes in household cats and dogs. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.18, p. 85-91, 2011.
- BERGSON, L. C.; FERNANDES, C. N. Tinea capitis: study of asymptomatic carriers and sick adolescents, adults and elderly who live with children with the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 87-91, 2001.
- BOND, R. Superficial veterinary mycoses. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 226-236, 2010.
- BRASCH, J. Pathogenesis of tinea. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 8, p. 780-786, 2010.
- BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; MONTEIRO, A. J.; MEIRELES, T. E. F.; SIDRIM, J. J. C. Tinea capitis in a dermatology center in the city of Fortaleza, Brazil: the role of *Trichophyton tonsurans*. **International Journal of Dermatology**, v. 43, p. 575-579, 2004.

BROUTA, F.; DESCAMPS, F.; MONOD, M.; VERMOUT, S.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Secreted metalloprotease gene family of *Microsporium canis*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 5676-5683, 2002.

CAFARCHIA, C.; FIGUEREDO, L.A.; COCCIOLI, C.; CAMARDA, A.; OTANTRO, D. Enzymatic activity of *Microsporium canis* and *Trichophyton mentagrophytes* from breeding rabbits with and without skin lesions. **Mycoses**, v. 55, p. 45-49, 2011.

CARRER, U. Pesquisa de dermatófitos em solo de praças e parques públicos da cidade de São Paulo. 2018. 27 p. [Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental] – Universidade Paulista, São Paulo, 2018.

CHERMETTE, R.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Dermatophytosis in animals. **Mycopathologia**, v. 166, p. 385-405, 2008.

CHINNAPUN, D. Virulence factors involved in pathogenicity of dermatophytes. **Walailak Journal of Science and Technology**, v. 12, p. 573-580, 2015.

COPETTI, M.V.; SANTURIO, J.M.; CAVALHEIRO, A.S.; BOECK, A.A.; ARGENTA, J.S.; CANABARRO, L.; ALVES, S.H. Dermatophytes isolated from dogs and cats suspected of dermatophytosis in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 119-124, 2006.

COULIBALY, O.; L'OLLIVIER, C.; PIARROUX, R.; RANQUE, S. Epidemiology of human dermatophytoses in Africa. **Medical Mycology**, v. 58, p. 1-17, 2017. Doi: 10.1093/mmy/myx048.

COUTINHO, S.D. Dermatofitoses. In: CUBAS, Z.; SILVA, J.C.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens**, Roca: São Paulo. p.1411-1419, 2014.

CRIADO, P.R.; OLIVEIRA, C.B.; DANTAS, K.C.; TAKIGUTI, F.A.; BENINI, L.V.; VASCONCELLOS, C. Superficial mycosis and the immune response elements. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 726-731, 2011.

de HOOG, S.G.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M.J. **Atlas of clinical fungi**. 2. ed. Utrecht: CBS Publications, CD-ROM, 2005.

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

DIAS, T.; FERNANDES, O.F.; SOARES, A.J.; PASSOS, X.S.; COSTA, M.; SOUZA, L.K.; SILVA, M.R.R. Tinha do couro cabeludo em crianças em Goiânia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 653-655, 2003.

DUKIK, K.; de HOOG, G.S.; STIELOW, J.B.; FREEKE, J.; van den ENDE, B.G.; VICENTE, V.A.; MENKEN, S.B.; AHMED, S.A. Molecular and phenotypic characterization of *Nannizzia* (Arthrodermataceae). **Mycopathologia**, v. 185, p. 9-35, 2020.

ELAVARASHI, E.; KINDO, A. J.; RANGARAJAN, S. Enzymatic and non-enzymatic virulence activities of dermatophytes on solid media. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, p. 23-25, 2017.

FRAGA, C.F.; SPANAMBERG, A.; FERREIRO, L.; SILVA, G.; FRANCHESCHI, N.T.; SILVA, I.T.; VARGAS, R.C. Dermatofitos em gatos sem dermatopatias na região metropolitana de Florianópolis, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, ID 1430, 2017.

GARCÍA-AGUDO, L.; ESPINOSA-RUIZ, J. J. Tiña capitis por *Mycrosporium gypseum*, una especie infrecuente. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 116, p. 296-299, 2018.

GARCÍA-MARTOS, P.; RUIZ-ARAGÓN, J.; GARCÍA-AGUDO, L.; LINARES, M. Dermatofitosis por *Mycrosporium gypseum*: descripción de ocho casos y revisión de la literatura. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 21, p. 147-149, 2004.

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

GNAT, S.; NOWAKIEWICZ, A.; LAGOWSKI, D.; ZIEBA, P. Host-and pathogen-dependent susceptibility and predisposition to dermatophytosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, p. 823-836, 2019.

GOMES, R. A.; MADRID, M. I.; MATOS, B. C.; TELLES, J. A.; WALLER, B. S.; NOBRE, O. M.; MEIRELES, A. C. M. Dermatopatias fúngicas: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, p. 272-284, 2012.

GRÄSER, Y.; MONOD, M.; BOUCHARA, P. J.; DUKIK, K.; NENOFF, P.; KARGL, A.; KUPSCH, C.; ZHAN, P.; PACKEU, A.; CHATURVEDI, V.; de HOOG, S. New insights in dermatophyte research. **Medical Mycology**, v. 56, p. S2-S9, 2018. Doi: 10.1093/mmy/myx141.

HAYETTE, P. M.; SACHELI, R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, p.164-179, 2015.

HELLGREN, L.; VINCENT, J. Lipolytic activity of some dermatophytes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 13, p. 155-157, 1980.

IORIO, R.; CAFARCHIA, C.; CAPELLI, G.; FASCIOCCO, D.; OTRANTO, D.; GIANGASPARO, A. Dermatophytoses in cats and humans in central Italy: epidemiological aspects. **Mycoses**, v. 50, p. 491-495, 2007.

LAGOWSKI, D.; GNAT, S.; NOWAKIEWICZ, A.; OSINSKA, M.; TROSCIANCZYK, A.; ZIEBA, P. Dermatophytosis with concurrent *Trichophyton verrucosum* e *T. benhamie* in calves after long-term transport. **Veterinary Dermatology**, v. 31, p. 414-e1111, 2020.

LANA, D. F. D.; BATISTA, G. B.; ALVES, H. S.; FUENTEFRIA, M. A. Dermatofitoses: agentes etiológicos, formas clínicas, terapêuticas e novas perspectivas de tratamento. **Clinical and Biomedical Research**, v. 36, p. 230-241, 2016.

LEMSADDEK, A.; CHAMBEL, L.; TENREIRO, R. Incidence of fungalsin and subtilisin virulence genes in dermatophytes. In: MENDÉZ-VILAS, A. (ed.), **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. Microbiology Book Series 2. Rioja: Formatex, 2010. p. 658–665.

MACÊDO, C. P. D.; NEVES, P. R.; LOPES, C. F. Case report: disseminated dermatophytosis by *Microsporum gypseum* in a systemic Lupus erythematosus patient. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 25-27, 2008.

MADRID, I. M.; GOMES, A. R.; MATTEI, A. S.; SANTIN, R.; CLEFF, M. B.; FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A. Dermatofitose neonatal canina por *Microsporum gypseum*. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, p. 73-78, 2012.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Pathogenesis of dermatophytosis: sensing the host tissue. **Mycopathologia**, v. 182, p. 215-227, 2017.

MENDES, C. A.; BONCI, M. M.; BARONI, F. A. Avaliação *in vitro* da atividade hemolítica de isolados clínicos e ambientais de fungos dermatófitos. **Pubvet Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 15, p. 1-6, 2021.

MONACO, S.; SPARANO, V.; GIOIA, M.; SBARDELLA, D.; DI PIERRO, D.; MARINI, S.; COLETTA, M. Enzymatic processing of collagen IV by MMP-2 (gelatinase A) affects neutrophil migration and it is modulated by extracatalytic domains. **Protein Science**, v. 15, p. 2805-2815, 2006.

MONOD, M. Secreted proteases from dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, p. 285-294, 2008.

MORETTI, A.; AGNETTI, F.; MANCIANTI, F.; NARDONI, S.; RIGHI, C.; MORETTA, I.; MORGANTI, G.; PAPINI, M. Dermatophytosis in animals: epidemiological, clinical and zoonotic aspects. **Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia**, v. 148, p. 563-572, 2013.

MUHSIN, T.M.; AUBAID, A.H.; AL-DUBOON, A.H. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Mycoses**, v. 40, p. 465-469, 1997.

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

NAYAK, A.P.; GREEN, B.J.; BEEZHOLD, D.H. Fungal hemolysins. **Medical Mycology**, v. 51, p. 1-16, 2013.

NENOFF, P.; KRUGER, C.; GINTER-HANSELMAYER, G.; TIEZ, H. Mycology - an update. Part 1: Dermatophytes: causative agents, epidemiology and pathogenesis. **Journal of Germany Society of Dermatology**, v. 12, p. 188-209, 2013.

NEVES, J. J. A.; PAULINO, A. O.; VIEIRA, R. G.; NISHIDA, E. K.; COUTINHO, S. D. A. The presence of dermatophytes in infected pets and their household environment. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, p. 1747-1753, 2018.

NGWOGU, A. C.; OTOKUNEFOR, T. V. Epidemiology of dermatophytoses in a rural community in Eastern Nigeria and review of literature from Africa. **Mycopathologia**, v. 164, p. 149-158, 2007.

NWEZE, E.I. Etiology of dermatophytoses amongst children in northeastern Nigeria. **Medical Mycology**, v. 39, p. 181-184, 2001.

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

PONTES, S. V. B. Z.; OLIVEIRA, C. A.; GUERRA, S. Q. F.; PONTES, A. R. L.; SANTOS, P. J. Distribution of dermatophytes from soils of urban and rural areas of cities of Paraíba State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 377-383, 2013.

PRICE, M. F.; WILKINSON I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, p. 7-14, 1982.

RÜCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, p. 233-244, 1982.

SCHAUFUSS, P.; STELLER, U. Haemolytic activities of *Trichophyton* species. **Medical Mycology**, v. 41, p. 511-516, 2003.

SEGAL, E.; FRENKEL, M. Dermatophyte infections in environmental contexts. **Research in Microbiology**, v. 66, p. 564-569, 2015.

SIQUEIRA A.B.S. Perfil enzimático de dermatófitos e avaliação da atividade antifúngica de própolis e lecitinas, 177 p. [Doutorado em Ciências Biológicas] – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

SOUZA, T.F.; SCROFERNEKER, M.L.; COSTA, J.M.; CARISSIMI, M.; CORBELLINI, V. A. Secretion of five extracellular enzymes by strains of chromoblastomycosis agents. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 269-272, 2008.

SOUZA, P.M.; BITTENCOURT, M.A.; CAPRARA, C.C.; FREITAS, M.; ALMEIDA, R.P.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y.M.; FERREIRA FILHO, E.X.; PESSOA JUNIOR, A.; MAGALHÃES, P.M. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 337-346, 2015.

SOUZA, B.S.; ANDRADE, C.; KISZEWSKI, A.E.; SARTORI, D.S.; WEISHEIMER, E. Dermatophytosis caused by *Microsporum gypseum* in infants: report of four cases and review of the literature. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, p. 823-825, 2016.

SRIRANGANADANE, D.; WARIDEL, P.; SALAMIN, K.; FEUERMANN, M.; MIGNON, B.; STAIB, P.; NEUHAUS, J. M.; QUADRONI, M.; MONOD, M. Identification of novel secreted proteases during extracellular proteolysis by dermatophytes at acidic pH. **Proteomics**, v.11, p. 4422-4433, 2011.

TARABEES, R.; SABRY, M.; ABDEEN, E. Incidence of fungalysin virulence genes (MEP 1–5) in dermatophytes isolated from infected cases in Egypt. **Assiut Veterinary Medical Journal**, v. 61, p. 56-64, 2015.

TORRES, E.L.M.; HERCULANO, P.N.; LIMA, M.L.F.; SOARES, P.T.; SIQUEIRA, A.B.S.; SOUZA-MOTTA, C.M.; PORTO, A.L.F.; NASCIMENTO, C.O. Isolamento e perfil enzimático de cães e gatos com dermatofitose atendidos em hospitais veterinários do Recife, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 930-934, 2018.

TORRES-GUERRERO, E.; GONZÁLEZ DE COSSÍO, A. C.; SEGUNDO, Z. C.; CERVANTES, O. R. A.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. *Microsporum canis* and others dermatophytes isolated from humans, dogs and cats in Mexico City. **Global Dermatology**, v. 3, p. 275-278, 2016.

VERMOUT, S.; BALDO, A.; TABART, J.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Secreted dipeptidyl peptidases as potential virulence factors for *Microsporum canis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 54, p. 299-308, 2008a.

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

VIANI, F.C.; SANTOS, J.I.; PAULA, C.R.; LARSSON, C.E.; GAMBALE, W. Production of extracellular enzymes by *Microsporum canis* and their role in its virulence. **Medical Mycology**, v. 39, p. 463-468, 2001.

YIKE, I. Fungal proteases and their pathophysiological effects. **Mycopathologia**, v. 171, p. 299-323, 2011.

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