

Centro Universitário de Patos - UNIFIP
 Curso de Medicina
 v. 5, n. 2, abr/jun 2020, p. 13-19.
 ISSN: 2448-1394



USO DE GRISEOFULVINA FRENTE A FUNGOS DO GÊNERO *Microsporum*

USE OF GRISEOFULVINE AGAINST FUNGI OF THE GENDER Microsporum

Francisco Patricio de Andrade Júnior
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba - Brasil
juniorfarmacia.ufcg@outlook.com

Laísa Vilar Codeiro
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba - Brasil
laisavilar@gmail.com

Edeltrudes de Oliveira Lima
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba - Brasil
edelolima@yahoo.com.br

RESUMO

Objetivo: O presente estudo teve como objetivo, elucidar o grau de sensibilidade de isolados clínicos e adquiridos comercialmente de cepas de *M. canis* e *M. gypseum*.

Métodos: Para avaliar o grau de sensibilidade das cepas analisadas, utilizou-se o método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio de microdiluição seriada, na razão 1:2.

Resultados: Das 15 cepas estudadas, observou-se que todas se apresentaram resistentes a griseofulvina, uma vez que, verificou-se CIM superior a 3 µg/mL para todos os micro-organismos investigados.

Conclusões: Os resultados expostos nesta pesquisa servem como fonte de alerta para a necessidade da busca de novas moléculas com atividade anti-*Microsporum*.

Palavras-Chave: Farmacologia. Antimicrobianos. Dermatofitos.

ABSTRACT

Objective: The present study aimed to elucidate the degree of sensitivity of clinical isolates and commercially acquired strains of *M. canis* and *M. gypseum*.

Methods: To assess the degree of sensitivity of the strains analyzed, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method was used by means of serial microdilution, in the ratio 1: 2.

Results: Of the 15 strains studied, it was observed that all were resistant to griseofulvin, since MIC was found to be greater than 3 µg / mL for all investigated microorganisms.

Conclusions: The results exposed in this research serve as an alert for the need to search for new molecules with anti-*Microsporum* activity.

Keywords: Pharmacology. Antimicrobials. Dermatophytes.

1. Introdução

Dermatofitose, popularmente conhecida como tinha, trata-se de um tipo de micose superficial e zoonótica¹ que pode ser causada por fungos dos gêneros *Epidermophyton*, *Trichophyton* e *Microsporum*, também denominados de dermatófitos.

Os fungos do gênero *Microsporum* se caracterizam, microscopicamente, por apresentarem macroconídios septados que podem estar isolados ou agrupados, com extremidades arredondadas, potiagudas ou fusiformes².

Estes fungos apresentam a capacidade de invadir tecidos queratinizados, podendo se propagar em pele, pelos e unhas³.

Os dermatófitos podem acometer tanto seres humanos, quanto animais, sendo as tinhas classificadas conforme a sua localização anatômica em: *tinea capitis* (couro cabeludo), *tinea pedis* (pés), *tinea corporis* (corpo), *tinea cruris* (região inguinal) e *tinea unguium* (unhas)³. Contudo, micro-organismos do gênero *Microsporum*, em geral estão associados a tinhas do couro cabelo e pele.

Clinicamente, a *tinea capitis* é caracterizada por prurido, descamação e alopecia, enquanto que a *tinea corporis* apresenta a presença de lesões de aspecto anelar com contornos delimitados³.

O tratamento farmacológico pode acontecer a partir da utilização de terbinafina, azólicos e griseofulvina, sendo este último fármaco considerado específico para o combate a dermatófitos do gênero *Microsporum*^{3,4}.

Contudo, diversos fenômenos de resistência têm sido associados a fármacos utilizados na terapêutica. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo, elucidar o grau de sensibilidade de isolados clínicos e adquiridos comercialmente de cepas de *M. canis* e *M. gypseum* através da Concentração Inibitória Mínima.

2. Métodos

2.1 Local de trabalho

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

2.2 Obtenção e preparação de griseofulvina

Para a realização dos estudos *in vitro* a griseofulvina foi adquirida comercialmente

da Sigma Aldrich®, São Paulo, Brasil. A preparação se deu a partir da solubilização desse fármaco com Tween 80® a 2% e dimetilsulfóxido (DMSO), em percentual de até 5%, completando-se o volume final para 5 mL, com água destilada esterilizada de forma a se obter uma emulsão dos produtos na concentração inicial de 1024 µg/mL^{5,6}.

2.3 Meios de cultura

Foram utilizados os meios Agar Sabouraud Dextrose (ASD) e RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato, adquiridos comercialmente da Difco Laboratories Ltd (USA, France) e INLAB, São Paulo, Brasil. Ambos os meios foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes, sendo solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121° C por 15 minutos.

2.4 Linhagens de *M. canis* e *M. gypseum*

As linhagens do gênero *Microsporium* foram adquiridas comercialmente e a partir do isolamento e identificação de material biológico de lesões de pele e do couro cabeludo de pacientes com hipótese de diagnóstico atendidos no Laboratório de Patologia Clínica – HEMATO, localizado na cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil. Os micro-organismos utilizados na pesquisa incluíram: *M. canis* ATCC - 36299 e LM - 45, 68, 110, 256, 343, 345, 366 e 665 e *M. gypseum* ATCC - 24102 e LM - 05, 07, 129, 130 e 184. Estes, foram mantidos armazenados em meio ASD, sob refrigeração, a uma temperatura de 4°C. Além disso, estas linhagens foram registradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado sob o número AA1970F e o trabalho foi devidamente aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, UFPB, com o seguinte número de parecer: 3.770.492.

2.5 Inóculo

Para a preparação do inóculo, foi realizada uma subcultura dos micro-organismos em tubos estéreis contendo Agar Saboroud Dextrose (ASD), durante 5 a 7 dias a 35° C. Após esse período de incubação uma alíquota do meio contendo o fungo foi coletada e, em seguida, suspensa em solução fisiológica estéril a 0,9%. A suspensão resultante foi agitada por meio de vórtex e, logo após, a densidade do inóculo foi padronizada conforme a escala de McFarland 0,5 para a obtenção de 10⁶ UFC/mL^{5,7-9}.

2.6 Concentração Inibitória Mínima

Para a avaliação da atividade antifúngica de griseofulvina, foi utilizado o método de microdiluição em caldo realizado a partir de placas estéreis, contendo 96 cavidades de fundo em "U", próprias para a microdiluição.

Em cada uma das cavidades foi adicionado 100 µL de caldo RPMI duplamente concentrado. E posteriormente, 100 µL da substância investigada, foi dispensada somente nas cavidades da primeira linha da placa de microdiluição. Após esse processo, as substâncias alvo foram diluídas de forma seriada na razão 1:2. Em seguida, foi adicionado 10 µL do inóculo, da suspensão dos micro-organismos, em cada uma das cavidades. Por fim, foi feito o controle de viabilidade dos micro-organismos (meio de cultura com as linhagens fúngicas) e de esterilidade (somente o meio de cultura) nas duas últimas linhas da microplaca. Esse ensaio foi realizado em triplicata ^{5,10-12}.

As placas foram fechadas e incubadas à temperatura ambiente (28°C±2) durante 5 a 7 dias ¹²⁻¹⁴. Decorrido o tempo delimitado, foi realizada a leitura para registro dos dados. A CIM foi considerada como a menor concentração do agente antifúngico, responsável por impedir o crescimento visível do micro-organismo.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) de griseofulvina frente a fungos do gênero *Microsporium*.

3. Resultados e Discussão

Na tabela 1 é possível observar a CIM de griseofulvina para diferentes cepas e linhagens do gênero *Microsporium*.

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima de griseofulvina frente a espécies de *M. canis* e *M. gypseum*.

Cepas	Griseofulvina (µg/mL)	Controle de viabilidade	Controle de esterilidade
<i>M. canis</i>			
ATCC - 36299	>1024	+	-
LM - 45	>1024	+	-
LM - 68	64	+	-
LM - 110	64	+	-
LM - 256	64	+	-
LM - 343	>1024	+	-
LM - 345	>1024	+	-
LM - 366	>1024	+	-
LM - 665	>1024	+	-
<i>M. gypseum</i>			
ATCC - 24102	128	+	-
LM - 05	128	+	-
LM - 07	128	+	-
LM - 129	>1024	+	-
LM - 130	16	+	-
LM - 184	>1024	+	-

+ crescimento de micro-organismos; - ausência de crescimento.

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

A griseofulvina apresentou em sua grande maioria valores de CIM superiores a 1024 µg/ mL. Além disso, considerou-se como resistente as cepas que apresentaram valores de CIM superiores a CIM > 3 µg/mL¹⁵, indicando que as 15 cepas estudadas apresentaram-se resistentes a esse fármaco.

Este resultado está de acordo com estudos que buscaram avaliar a atividade anti-*Microsporum* de griseofulvina, em que evidenciou-se predomínio de cepas resistentes^{15,16}. Tal achado torna-se preocupante, uma vez que, griseofulvina é um fármaco específico para o combate de dermatófitos, indicando que em pacientes que tiveram contato com essas cepas fúngicas o tratamento foi extremamente delicado, fazendo-se necessário o uso de associação de diferentes fármacos para poder debelar a infecção já que a associação entre antifúngicos pode driblar possíveis mecanismos de resistência, permitir o uso de menores concentrações e causar menos efeitos adversos^{3,17,18}.

Assim, os altos valores de CIM encontrados, pode estar associada ao fato de esses micro-organismos já apresentarem mecanismos específicos contra esse fármaco, em especial o aumento da expressão de bombas de efluxo associadas ao aumento da expressão dos genes TruMDR1, TruMDR2 e transportadores do tipo ABC^{19,20}.

Devido a exatidão literária de estudos associados a fungos do gênero *Microsporum*, torna-se dificultado a reunir dados relacionados ao perfil de sensibilidade que esses micro-organismos apresentam a fármacos utilizados na terapêutica. Dessa forma, os dados expressos nesse estudo servem de alerta e comprova grande resistência que certas cepas apresentam diante da griseofulvina.

4. Conclusões

Das 15 cepas estudadas, observou-se que todas apresentaram-se resistentes a griseofulvina, em que os valores de CIM variaram entre 16 a >1024 µg/mL. Os resultados expostos nesta pesquisa servem como fonte de alerta para a necessidade da busca de novas moléculas com atividade anti-*Microsporum*.

Referências

1. Silva DTF. Será fungo?. Rev Port Clin Geral. 2011; 27: 96-108.
2. Diego AM. Aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos de las dermatofitosis. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica; 2011, 29: 33-39.
3. Lana DFD, Batista BG, Alves SH, Fuentefria AM. Dermatofitoses: agentes etiológicos, formas clínicas, terapêutica e novas perspectivas no tratamento. Clin Biomed Res. 2016; 36(4): 230-41.
4. Hay R. Superficial fungal infections. Medicine. 2017; 45(11): 707-11.

5. Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. Antibiotics in Laboratory Medicine. New York: Williams & Wilkins; 1991: 739-88.
6. Pereira FO, Mendes JM, Lima IO, Mota KSL, Oliveira WA, Lima EO. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharm. Biol.* 2014; 53(2): 1-7.
7. ABERKANE, A. et al. Comparative evaluation of two different methods of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50: 719-22.
8. NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002a.
9. NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. Documento M38-A do NCCLS [ISBN 1-56238-470-8]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002b.
10. Ellof, J.N. A sensitive and quick microplate method to determined the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*; 1998, 64: 711-13.
11. KLEPSE, M. E.; ERNST, E. J.; LEWIS, R. E.; ERNS, M. E.; PFALLER, M. A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother*; 1998, 42(5): 1207-12.
12. NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/cls/cls_opasm7_a6.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2019.
13. Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, Chin NX, Cooper Júnior C, Fothergill A, McGinnis MR, Menezes P, Messer SA, Nelson PW, Odds FC, Pasarell L, Peter J, Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG, Shankland GS, Walsh TJ, Weitzman I. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of Filamentous Fungi. *J Clin Microbiol*; 1997, 35(1): 139-43.
14. Mota KSL, Pereira FO, Oliveira WA, Lim IO, Lima EO. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil and Its Constituent Phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with Ergosterol. *Molecules*; 2012, 17: 14418-433.
15. Khurana A, Sardana K, Chowdhary A. Antifungal resistance in dermatophytes: recent trends and therapeutic implications. *Fungal Genet Biol*; 2019, 132.

16. Nardoni S, Mugnaini L, Papini R, Fiaschi M, Mancianti F. Canine and feline dermatophytosis due to *Microsporum gypseum*: a retrospective study of clinical data and therapy outcome with griseofulvin. *J Mycol Med*; 2013, 23(3): 164-67.
17. Lana AJDL, Pippi B, Carvalho AR, Moraes CR, Kaiser S, Ortega GG, Fuentefria AM, Silveira GPS. In Vitro additive effect on griseofulvin and terbinafine combinations against multidrug-resistant dermatophytes. *Braz. J. Pharm. Sci*; 2018, 52(2): 1-9.
18. Andrade Júnior FP, Teixeira APC, Lima WA, Lima EO, Lima IO. Estudo de associação do timol com a anfotericina B contra *Rhizopus orizae*. *Periódico Tchê Química*; 2019, 16(31): 156-63.
19. Peres NTA, Maranhão FCA, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. *An Bras Dermatol*; 2010, 85(5): 657-67.
20. Silva CS, Neufeld PM, Gouvêa EH, Abreu PA. Etiologia e epidemiologia da tinea capitis: relato de série de casos e revisão da literatura. *RBAC*; 2019, 51(1): 9-16.