

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências  
Pós-Graduação em Biologia de Fungos

**MARIA DANIELA SILVA BUONAFINA**

**CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE FUNGOS QUANTO AOS  
GLICOCONJUGADOS DA SUPERFÍCIE CELULAR E FORMAÇÃO DE BIOFILME  
PARA AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO NA OTOMICOSE EXPERIMENTAL**

Recife  
2014

**MARIA DANIELA SILVA BUONAFINA**

**CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE FUNGOS QUANTO AOS  
GLICOCONJUGADOS DA SUPERFÍCIE CELULAR E FORMAÇÃO DE BIOFILME  
PARA AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO NA OTOMICOSE EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rejane Pereira Neves

Recife  
2014

Buonafina, Maria Daniela Silva

Caracterização *in vitro* de fungos quanto aos glicoconjugados da superfície celular e formação de biofilme para avaliação do tratamento na otomicose experimental / Maria Daniela Silva Buonafina- Recife: O Autor, 2014.

**74 folhas: il., fig., tab.**

**Orientadora: Rejane Pereira Neves**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2014.**

Inclui referências

1. Micoose 2. Infecção 3. Biofilme I. Neves, Rejane Pereira (orient.) II. Título

616.969

CDD (22.ED.)

UFPE/CB-2017- 432

**MARIA DANIELA SILVA BUONAFINA**

**CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE FUNGOS QUANTO AOS  
GLICOCONJUGADOS DA SUPERFÍCIE CELULAR E FORMAÇÃO DE BIOFILME  
PARA AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO NA OTOMICOSE EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 26/02/2014

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profª Drª Rejane Pereira Neves/  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

---

Dr André Ferraz Goiana Leal/  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

---

Prof. Dr. Guilherme Maranhão Chaves  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Aos meus pais, Ronaldo e Fátima.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco por proporcionar atividades durante a pós-graduação que me fizeram amadurecer profissionalmente e ao CNPq, pela bolsa de estudos.

Ao Departamento de Micologia pela estrutura para o desenvolvimento do trabalho.

A Orientadora Prof<sup>a</sup>. Rejane Pereira Neves e ao co-orientador Prof. Reginaldo Gonçalves Lima-Neto, pelo incentivo e orientação efetiva durante esses dois anos.

A Prof<sup>a</sup>. Oliane Magalhães, Prof. Armando Marsden e Rubem Moraes pelos ensinamentos, atenção durante esses anos de convivência.

Ao Prof. Eduardo Beltrão (LIKA) e Me. Arthur Clark (LIKA), pelo trabalho integrado, fornecendo as lectinas para a realização desta pesquisa.

A Prof<sup>a</sup> Genira e ao Dr. Mateus Campos pela atenção e por me acompanhar no uso do leitor de microplacas na UFRPE.

Ao Prof. Almir Gonçalves Wanderley, a Dr<sup>a</sup> Alice Araújo e aos colegas que cederam espaço no Biotério (Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-clínica de Compostos Bioativos) e colaboraram com a parte experimental desta pesquisa.

Aos professores e profissionais da Micoteca URM: Prof<sup>a</sup>. Cristina Souza-Motta, Prof<sup>a</sup>. Maria José Fernandes, Prof<sup>a</sup>. Débora Lima, Eliane Barbosa, que contribuíram com a identificação morfológica dos isolados fúngicos desta pesquisa.

A amiga Pamella de Britto Ximenes e ao amigo Sílvio Francisco Pereira Junior pelo companheirismo, ajuda efetiva e parceria ao longo destes dois anos.

Aos amigos e companheiros do Departamento de Micologia: Dr<sup>a</sup>. Ildnay Brandão, Dr<sup>a</sup>. Fabíola Couto, Dr<sup>a</sup>. Heloisa Moraes, Ma. Aline Julião, Ma. Marília Gomes, Me. Michellângelo Nunes, Walter Pinto, Me. Sérgio Murilo, Me. Rafael Vilela, Dr. Jadson Bezerra, Dr<sup>a</sup>. Elvislene Leite, Dr<sup>a</sup>. Suanni Lemos, Gabrielli Oliveira, Ma. Ana Emília Medeiros, Me. Franz Assis, Me. Melyna Leite, Dr<sup>a</sup>. Carol Sanuzi, Ma. Sandra Sá, Dr<sup>a</sup>. Carolina Silva, Dr. André Ferraz, Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Parahym, Prof<sup>a</sup>. Danielle Macêdo que trabalharam e me acompanharam nos experimentos desta pesquisa.

A minha família e a Deus pela saúde, disposição, equilíbrio e sabedoria para produção deste trabalho.

## RESUMO

A otomicose, infecção do conduto auditivo externo, tendo como agentes mais comuns espécies de *Aspergillus* e *Candida*. No tratamento, tem se verificado crescente resistência antifúngica. Fatores relacionados aos fungos como constituição da parede celular e formação de biofilmes podem propiciar maior dano e extensão da lesão. Assim, esta pesquisa objetivou caracterizar agentes de otomicose quanto ao perfil de carboidratos da parede celular, capacidade de formar biofilme, selecionar a cepa mais virulenta e avaliar tratamento experimental com ciclopirox olamina. As lectinas Com A, WGA, UEA-I e PNA conjugadas à peroxidase foram utilizadas para marcação dos carboidratos em 28 isolados. E foram crescidos em Sabouraud e RPMI para análise do biofilme com leitura visual e quantificada. Foram testados cetoconazol, anfotericina B e ciclopirox olamina através da microdiluição em caldo com leitura visual e absorbância. Otomicose experimental foi reproduzida com o isolado mais virulento e o tratamento seguiu com cetoconazol e ciclopirox olamina. Marcação com lectinas variou intra e interespecífica na expressão de carboidratos, sendo WGA a que marcou mais intensamente e também variou quanto ao biofilme. A inibição com anfotericina B variou entre 0,125-16µg/ mL; cetoconazol 0,5-8µg/ mL e ciclopirox olamina 0,25-8µg/ mL. A infecção foi confirmada pela visualização de estruturas em parasitismo e isolamento do fungo. A composição da superfície dos isolados com expressão de *N*-acetil-glicosamina contribuiu para o biofilme, proporcionando resistência antifúngica e maior capacidade de infecção, porém ciclopirox olamina pode ser uma nova alternativa para o tratamento da otomicose.

**Palavras-chave:** Otite fúngica. Carboidratos da parede celular. Modelo experimental.

## ABSTRACT

Otomycosis, infection of the external auditory canal, having *Aspergillus* and *Candida* as the most common agents. In treatment, there has been increasing antifungal resistance. Factors related to fungi such as constitution of the cell wall and formation of biofilms can provide greater damage and extension of the lesion. The aim of this research was to characterize otomycosis agents in relation to carbohydrate profile of the cell wall, ability to form biofilm, select the most virulent strain and evaluate experimental treatment with cyclopirox olamine. The lectins with A, WGA, UEA-I and PNA conjugated to peroxidase were used to label carbohydrates in 28 isolates. And were grown in Sabouraud and RPMI for biofilm analysis with visual and quantified reading. Ketoconazole, amphotericin B and cyclopirox olamine were tested by broth microdilution with visual readout and absorbance. Experimental otomycosis was reproduced with the most virulent isolate and treatment followed with ketoconazole and cyclopirox olamine. Markings with lectins varied intra and interspecific in the expression of carbohydrates, being WGA the one that marked more intensely and also varied as for the biofilm. Inhibition with amphotericin B ranged from 0.125-16 µg/mL; Ketoconazole 0.5-8 µg/mL and cyclopirox olamine 0.25-8 µg/mL. The infection was confirmed by the visualization of structures in parasitism and fungus isolation. The surface composition of N-acetyl-glycosamine-like isolates contributed to biofilm, providing antifungal resistance and increased infectivity, but cyclopirox olamine may be a new alternative for the treatment of otomycosis.

**Key-words:** Otitis fungal. Cell wall carbohydrates. Experimental model.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Características da macroscópicas de <i>Aspergillus ochraceus</i> quando semeados nos meios de cultura CZ (A), MEA (B) e CYA25 (C). .....	43
Figura 2	Macroscopia de <i>A.tamarii</i> : colônia com textura plana, coloração verde-oliva amarronzada (A), reverso incolor a amarelo-acinzentado (B); na microscopia, vesícula globosa (C), conídios globosos (D) em ágar Czapek.....	44
Figura 3	Aspectos morfológicos de <i>Aspergillus parasiticus</i> . Macroscopia verso (A), reverso (B) e microscopia (C), apresentando uma colônia em meio Czapek.....	44
Figura 4	Cabeça conidial de <i>A. flavus</i> , evidenciando os conídios suavemente enrugados.....	45
Figura 5	Aspectos morfológicos de <i>Aspergillus niger</i> . Macroscopia verso (A), reverso (B) apresentando uma colônia sulcada em meio Czapek; e microscopia (C).....	46
Figura 6	Aspectos morfológicos de <i>Aspergillus awamori</i> . Macroscopia do verso (A), reverso (B) apresentando colônia sulcada em meio Czapek; e microscopia (C).....	46
Figura 7	Aspectos macroscópicos (A) e microscópicos (B) de <i>A. niveus</i> , semeado em meio Czapek.....	47
Figura 8	Aspectos morfológicos de <i>A. fumigatus</i> , evidenciando a macroscopia, verso (A) e reverso (B); e a microscopia (C e D).....	47
Figura 9	Avaliação e confirmação da espécie do isolado URM7048, pelo método automatizado VITEK 2® Systems.....	48
Figura 10	Avaliação e confirmação da espécie do isolado URM7049, pelo método automatizado VITEK 2® Systems.....	48
Figura 11	Padrões de coloração de lectinas: (a) intenso com wheat germ agglutinin (WGA) em <i>A. ochraceus</i> , (b) moderado em peanut agglutinin (PNA) em <i>A. niveus</i> , (c) fraco Ulex europeus agglutinin I (UEAI) em <i>A. ochraceus</i> e (d) ausente.....	51
Figura 12	Leitura da quantificação de biofilme por espécies de <i>Aspergillus</i> , obtida por meio da automação.....	52
Figura 13	Determinação das concentração inibitória mínima (CIM), obtida por leitura visual e absorbância, de espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Candida</i> , frente a cetoconazol.....	56

Figura 14	Determinação das concentração inibitória mínima (CIM), obtida por leitura visual e absorbância, de espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Candida</i> , frente a ciclopirox olamina.....	56
Figura 15	Exame direto de secreção do conduto auditivo externo animal: (A) hifas hialinas, septadas em dicotomia; (B) hifas hialinas septadas associadas ao tecido animal.....	58
Figura 16	Aspectos da infecção do conduto auditivo externo. (A) conduto auditivo externo (CAE); (B) Massa fúngica no CAE; (C) conduto auditivo externo recoberto por massa fúngica.....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Isolados fúngicos revisados taxonomicamente por meio da morfologia macro e microscópica.....	42
Tabela 2	Padrões de coloração com lectinas da parede celular de espécies de <i>Aspergillus</i> isolados de amostras clínicas de pacientes com otite fúngica.....	49
Tabela 3	Perfil de sensibilidade antifúngica de espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Candida</i> , obtidos de amostras clínicas de pacientes com otite fúngica, frente a ciclopirox olamina e cetoconazol. ....	54

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1	OBJETIVOS.....	14
1.1.1	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>14</b>
1.1.2	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>14</b>
1.2	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	15
1.2.1	<b>Obtenção de culturas.....</b>	<b>15</b>
1.2.2	<b>Caracterização taxonômica.....</b>	<b>15</b>
1.2.3	<b>Caracterização quanto ao perfil de carboidratos da parede celular.....</b>	<b>15</b>
1.2.4	<b>Avaliação da capacidade de formação de biofilme.....</b>	<b>17</b>
1.2.5	<b>Perfil de sensibilidade antifúngica <i>in vitro</i>.....</b>	<b>18</b>
1.2.6	<b>Modelo experimental de Otomicose.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>21</b>
2.1	MORFOLOGIA DA ORELHA.....	21
2.2	OTOMICOSE.....	23
2.2.1	<b>Agentes etiológicos.....</b>	<b>23</b>
2.2.2	<b>Fatores que predispõe a otite externa fúngica.....</b>	<b>27</b>
2.2.3	<b>Manifestações clínicas e sintomas.....</b>	<b>30</b>
2.2.4	<b>Diagnóstico.....</b>	<b>31</b>
2.2.4.1	Coleta de amostras clínicas.....	32
2.2.4.2	Exame direto.....	33
2.2.4.3	Obtenção da cultura.....	33
2.2.4.4	Histopatológico.....	34
2.2.4.5	Identificação dos agentes etiológicos.....	34
2.2.5	<b>Fatores de patogenicidade dos agentes da otomicose.....</b>	<b>35</b>
2.2.5.1	Perfil de carboidratos da parede celular fúngica.....	36
2.2.5.2	Formação de biofilme por fungos causadores de otomicose.....	38
2.2.6	<b>Terapia antifúngica em casos de otite fúngica.....</b>	<b>38</b>
2.2.7	<b>Modelo experimental da otomicose.....</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>ANÁLISE DOS RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
3.1	REVISÃO TAXONOMICA DE FUNGOS ISOLADOS DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE CASOS DE OTOMICOSE DEPOSITADOS NA MICOTECA URM.....	42

3.2	PERFIL DE CARBOIDRATOS DA PAREDE CELULAR DE FUNGOS OBTIDOS DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES COM OTITE FÚNGICA POR MEIO DE MARCAÇÃO DE LECTINAS.....	49
3.3	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR AGENTES DA OTOMICOSE.....	52
3.4	PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE OTOMICOSE.....	53
3.5	RESPOSTA TERAPÊUTICA À OTOMICOSE EXPERIMENTAL.....	58
4	<b>CONCLUSÃO.....</b>	60
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	61
	<b>ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (CEUA/UFPE) .....</b>	74

## 1 INTRODUÇÃO

Otomíose é uma infecção no canal auditivo externo causada por fungos oportunistas (NEMATÍ *et al.*, 2013). A incidência varia em diferentes áreas geográficas e é determinada principalmente pelas condições ambientais. Esta micose pode atingir percentagens elevadas em algumas regiões tropicais e subtropicais, constituindo até 25% das otites infecciosas. (IBEKWE; ONAKOYA, 2007; ANEJA; SHARMA; JOSHI, 2010; FASUNLA).

Os agentes mais comuns desta infecção fúngica incluem espécies de *Aspergillus* e *Candida* (GARCIA-AGUDO *et al.*, 2011), entretanto, outras também são relatadas como agentes de otomíose (MOGADAM *et al.*, 2009).

Os fatores que contribuem para que estes fungos sapróbios se tornem patógenos são vários (KOGA-ITO, 2006). Entretanto, um dos fatores de virulência de extrema importância é a capacidade destes fungos em formar agregados celulares gerando estruturas multicelulares que aderem a superfícies, formando biofilme, ocorrendo em resposta a uma variedade de condições (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). Os agregados celulares podem estar intimamente associados aos carboidratos da parede celular do fungo, sendo as lectinas, valiosas ferramentas para a investigação estrutural destes complexos de carboidratos, especialmente glicoproteínas, e para a análise de mudanças que ocorrem sobre a superfície celular durante os processos fisiológicos e patológicos (SHARON; LIS, 2001). Essa especificidade das lectinas com relação a diferentes carboidratos possibilita a sua utilização em pesquisas na área médica tais como investigação da superfície de células e caracterização de estádios de desenvolvimento de micro-organismos (KENNEDY *et al.*, 1995).

A maioria dos agentes causadores de otomíose, apesar de serem sapróbios, pode causar infecções oportunistas, com danos irreversíveis principalmente em imunossuprimidos. O histórico do paciente, o exame clínico (otoscopia), o diagnóstico laboratorial micológico, são indispensáveis para diagnóstico preciso e, assim instituir tratamento adequado específico (KWARTLER, 2003; SREEPADA; CARFRAE; KESSER, 2008; ABOULMAKARIM *et al.*, 2010; VENNEWALD; KLEMM, 2010), pois, normalmente a otomíose requer tratamento em longo prazo e tende a recorrer (OZCAN *et al.*, 2003).

O desenvolvimento de pesquisas que busca o conhecimento destes agentes patogênicos, sobretudo da determinação do perfil de virulência, auxilia na instituição de tratamento adequado, evitando recidivas e conduzindo a uma melhor qualidade de vida dos pacientes.

Diante do contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os agentes de otomicose quanto ao perfil de carboidratos da parede celular em associação com a capacidade de formação de biofilme e avaliar a virulência e tratamento da otomicose experimental.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Caracterizar os agentes de otomicose quanto ao perfil de carboidratos da parede celular em associação com a capacidade de formação de biofilme e avaliar a virulência e tratamento da otomicose experimental.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho correspondem às ações desenvolvidas para atingir o objetivo geral:

- a) Obter e revisar taxonomicamente culturas de fungos isolados de amostras clínicas de casos de otomicose depositados na Coleção de Cultura Micoteca URM;
- b) caracterizar a parede celular dos isolados, quanto ao perfil de carboidratos, com marcação de lectinas;
- c) avaliar a capacidade de formação de biofilme pelos agentes da otomicose;
- d) determinar o padrão de sensibilidade antifúngica dos agentes etiológicos de otomicose;
- e) selecionar o isolado mais virulento e avaliar o tratamento da otomicose experimental;
- f) verificar a resposta terapêutica de otomicose experimental.

## 1.2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 1.2.1 Obtenção de culturas

Para os ensaios *in vitro*, foram utilizados 27 isolados obtidos de casos de otomicose, sendo 23 que estão depositados na Coleção de Culturas Micoteca URM e quatro que serão estocados. Para o ensaio *in vivo*, foi selecionado apenas um isolado.

### 1.2.2 Caracterização taxonômica

Após a obtenção, a revisão taxonômica dos agentes etiológicos foi realizada através da observação dos aspectos morfológicos, os quais foram analisadas diferentes características macroscópicas como diâmetro, bordos, textura e coloração do verso e reverso das colônias, produção de pigmentos e tempo de crescimento (BARNETT et al., 2000; DE HOOG et al., 2000; KLICH, 2002) e, quando necessário, fisiológicos (BARNETT et al., 2000; DE HOOG et al., 2000; LACAZ et al., 2002).

A verificação das microestruturas somáticas e reprodutivas foram realizadas pela técnica de Dalmau (1929), por meio de microcultivos (cultivo sob lamínula), no qual fragmentos das colônias foram semeados em dois pontos equidistantes da placa contendo o meio de cultura específico para cada grupo de fungos, e sobre estes colocadas lamínulas previamente esterilizadas. A preparação permaneceu a temperatura de 28°C por aproximadamente sete a 15 dias conforme espécie em estudo. Em seguida, a lamínula do cultivo foi retirada, invertida e colocada sobre uma lâmina de vidro, contendo uma 40 µL de Azul de Amann (CARRANZA, 1949), para posterior observação microscópica de estruturas somáticas e reprodutivas.

As análises fisiológicas e bioquímicas foram realizadas através de testes quanto à fermentação pela utilização de compostos de carbono, assimilação pela utilização de compostos de carbono e nitrogênio (BARNETT et al., 2000; De HOOG et al., 2000), produção de urease (LACAZ et al., 2002) e produção de ácido acético (BARNETT et al., 2000).

### 1.2.3 Caracterização quanto ao perfil de carboidratos da parede celular

- Fungos filamentosos

*Concanavalin A* (Con A), *Wheat germ agglutinin* (WGA), *Ulex europeus agglutinin I* (UEA-I) e *Peanut agglutinin* (PNA), todas conjugadas a peroxidase (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foram usadas de acordo com a técnica modificada publicada por Leal *et al.* (2011). As amostras fúngicas foram cultivadas em meio ágar Czapek (Difco) por dez dias a 25°C. Uma fita adesiva, posicionada com a parte colante para baixo, foi levemente pressionada sobre a colônia do fungo. A fita foi subsequentemente removida e colocada longitudinalmente sobre lâminas de microscópio. Na fita com a amostra do fungo, foi adicionada 200 µL de tripsina por 8 minutos. Após esse tempo, a tripsina foi retirada e com tampão fosfato salino (PBS), em seguida foi adicionado 200 µL de lectina (25µg.mL<sup>-1</sup>) e deixado por 1h a 4°C.

A marcação com lectinas foi visualizada usando 3,3-diaminobendizina (DAB) e peróxido de hidrogênio em Tampão Fosfato Salino (PBS) por até 8 min. Entre cada etapa foram realizadas lavagens com PBS (2 x 5 min). Ensaios controle foram feitos por ligação da lectina na preparação do açúcar específico correspondente: *N-acetil-D-glucosamina*, *α-L-fucose*, *D-galactose* e metil-*α-D-manoside* para WGA, UEA I, PNA e Con A, respectivamente, a concentração de 300 mM. O controle da amostra de fungo na fita foi através da ausência da lectina.

- Leveduras

Na leitura da expressão de lectinas ligantes aos isolados de leveduras, foram utilizadas suspensões de 1mL de células (10<sup>7</sup> células por mL) preparadas a partir de colônias crescidas em meio Agar Sabouraud por 48 horas. As células de leveduras foram suspensas em solução de tampão fosfato salino (PBS) e em seguida centrifugadas (2000 rpm) dentro de *ependorfs* de 2mL por 10 minutos até formação de um conteúdo na forma de *pellet*. Posteriormente, este conteúdo foi ressuspenso em tripsina (0,1%) por três minutos a 37°C e uma nova centrifugação foi realizada, ressuspendendo o mesmo em solução de metanol conjugado a peróxido de hidrogênio por 5 minutos em temperatura ambiente. A cada intervalo das etapas mencionadas, o *pellet* foi lavado por meio de centrifugação em tampão fosfato salino (PBS) por 10 minutos, duas vezes seguidas. Após esta etapa, foi adicionada sobre as células de leveduras, as soluções de lectinas (25 µg.mL<sup>-1</sup>), e incubadas a 4°C por um período de uma hora. Em seguida ao período de incubação, o *pellet* foi novamente ressuspenso em solução PBS conforme mencionado em etapas anteriores. Para a

percepção da aglutinação de lectinas foi adicionado às células, um conjugado de 3,3-diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), por um período de permanência de 8 minutos. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado em solução de PBS antes da verificação da aglutinação das lectinas aplicadas.

O padrão de marcação foi avaliado por microscopia de luz e classificado qualitativamente como intenso (+++), moderado (++) , fraco (+) ou negativo (-), conforme Leal *et al.* (2011) adaptado de OZER (2000).

#### **1.2.4 Avaliação da capacidade de formação de biofilme**

- Fungos filamentosos

Culturas de fungos filamentosos foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose a 37°C por 72 h. Os esporos foram coletados por lavagem da superfície das culturas utilizando 5ml de tampão fosfato salina (PBS) pH 7,2 contendo *tween* 20 na concentração de 0,025% (v/v), subsequentemente foram submetidos a contagem em câmara de Neubauer e o inóculo ajustado para a concentração de 1x10<sup>5</sup> células em RPMI 1640 (Sigma) tamponado para pH 7.0 com MOPS 0,165M (MOWAT *et al.*, 2007).

Biofilmes foram produzidos em placas de microtitulação de fundo chato (96 poços), pela adição de 200 µL da suspensão celular padronizada em tampão MOPS-RPMI 1640 em cada orifício a cada período de tempo determinado (48h), incubado a 37°C. O meio de cultura foi removido dos orifícios e as células lavadas três vezes com PBS pH 7,2 para total remoção de células não aderentes (Mowat *et al.*, 2007). Todo o experimento foi realizado em triplicata.

O biofilme foi quantificado usando um versão modificada por O'TOOLE E KOLTER (1998) e posteriormente por MOWAT *et al.* (2007). As placas foram secas e coradas com 100µL de solução de cristal violeta 0,5% (p/v) por 5 minutos. A solução foi removida por lavagem cuidadosa sob água corrente para remoção do excesso. Os biofilmes foram descorados, adicionando 100µl de etanol 95% a cada poço por um minuto e, posteriormente, o etanol foi transferido para uma outra placa de microtitulação (96 poços) e a absorbância foi lida a 570 nm (A<sub>570</sub>). O experimento foi realizado em triplicata.

- Leveduras

O método para a produção de biofilme foi realizado de acordo com o protocolo MELO *et al.*, (2011), modificado. As leveduras foram cultivadas em agar Sabouraud dextrose durante 24h a 35°C. Após o tempo de crescimento, o inóculo foi padronizado em 3 mL de solução salina, com turvação comparável com o padrão da escala de 4 de Mac Farland. Alíquotas de 20 µL da suspensão foram transferidas para a placa de poliestireno, contendo 180 µL de Sabouraud líquido suplementado com 8% de glucose. Após 24h de incubação, a 35°C, foram removidas células planctônicas utilizando uma pipeta de Pasteur. Cada poço foi lavado duas vezes com 200 µL de PBS para remover as células fracamente aderidas. As placas foram secas durante 20 min a 35°C. Em seguida, 110 µL de violeta de cristal 0,4% foi adicionado em cada poço durante 45 min. Após este tempo, as placas foram lavadas três vezes com 200 µL com água Milli-Q esterilizada. Logo após, foi adicionado 200 µL de etanol em cada poço, por 45 minutos, para descorar o biofilme. Em seguida, 100 µL de cada poço foi transferido para uma nova placa, e a quantificação de biofilme foi avaliada, por meio de absorvância com espectrofotômetro (leitor de microplacas automático para LP400) a 595 nm. Os valores de absorvância dos controles negativos (poços sem isolados fúngicos), foram subtraídos dos valores dos poços nos quais havia os isolados testados, para minimizar potenciais interferências. Cada cepa foi testada em triplicata, e a quantificação da produção de biofilme foi definida como a média aritmética da absorvância dos três poços.

### **1.2.5 Perfil de sensibilidade antifúngica *in vitro***

O método utilizado seguiu as condições descritas no documento em M27-A3 (CLSI, 2008a) para leveduras e M38-A2 (CLSI, 2008b) para fungos filamentosos. O meio de cultura utilizado durante os experimentos foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH 7.0 ± 0.1, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; 0.165 mol.l<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de 0.22 µ (Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os fármacos comerciais utilizados foram o cetoconazol (Medley S.A.), como controle, e ciclopirox olamina (CPO); Medley S.A., Campinas–São Paulo, Brazil), ambos dissolvidos em DMSO. As concentrações testadas foram, para cetoconazol (CTZ) de 0.03 a 16 µg.mL<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>, e para ciclopirox olamina (CPO) de 0,06 a 32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para controle de qualidade foi incluída nos testes a linhagem *Candida parapsilosis* ATCC 22019, como recomendada pelos documentos (CLSI, 2008).

As leveduras foram mantidas em meio Sabouraud dextrose ágar (SDA; Difco) e incubadas a 35 °C. Foram preparadas as suspensões dos isolados, e sua densidade foi ajustada de acordo com a escala 0.5 de Mac Farland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530 nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5 mL de solução salina esterilizada (0,85%) e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de  $2\text{-}5\times 10^3$  céls. $\text{mL}^{-1}$ .

Os fungos filamentosos foram obtidos de tubos contendo o meio de cultura batata dextrose ágar (BDA; Difco) a 35°C por sete dias. Sequencialmente, propágulos fúngicos foram suspensos com 1mL de solução salina esterilizada (0,85%) adicionada de tween 20. Posteriormente, a suspensão foi transferida para tubos de ensaio esterilizados. Após o repouso por cinco minutos, o sobrenadante foi para o vórtex e ajustado em espectrofotômetro para 0.09 a 0.13 de densidade óptica a 530 nm. Após o ajuste, foi feita uma diluição de 1:50 para a obtenção de um inóculo final contendo  $0,4\times 10^4$  a  $5\times 10^4$  céls. $\text{mL}^{-1}$ .

Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com as drogas testadas, e as placas foram incubadas a 35°C durante dois dias antes de ler os resultados para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do CTZ e CPO. As CIM's tanto para CTZ quanto para CPO foram determinadas entre 80-100% de inibição em relação aos poços controles.

A inibição do crescimento foi demonstrada por observação visual, como recomendado pelo CLSI, e em leitora de microplaca Elx800, BioTek, Winooski, VT, USA, utilizando filtro 405 nm.

### **1.2.6 Modelo experimental de Otomicose**

Após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE), o estudo ocorreu no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-clínica de Compostos Bioativos/ UFPE, onde foi realizado todo o trabalho com os animais, desde a sua preparação, inoculação, tratamento até o sacrifício dos mesmos para o estudo

histológico, sendo a preparação e avaliação das lâminas realizadas no Departamento de Anatomia Patológica da UFPE. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, sadios, pesando entre 200-400g, adultos jovens que foram mantidos em gaiolas individuais com piso de serragem de madeira de pinho, iluminação artificial, temperatura  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e alimentados com ração. Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% por injeção intraperitoneal, em seguida foram colocados em decúbito lateral esquerdo, mantendo exposta a orelha direita. Sob otomicroscopia, utilizando-se um pipetador, foi inoculado, na orelha externa direita de cada animal, ao longo do conduto auditivo externo até a membrana timpânica, 100 $\mu\text{L}$  de suspensão contendo  $10^7$  UFC do isolado. Foram utilizados dois grupos com seis animais. Os dois grupos foram infectados, e após 15 dias, tratados. O primeiro grupo foi tratado com cetoconazol e o segundo, com ciclopirox olamina. O tratamento foi duração de 15 dias. Após o tratamento, os ratos foram sacrificados com dose letal de hidrato de cloral.

Após o sacrifício dos ratos, as bulas timpânicas foram retiradas, isolando-se das mesmas a membrana timpânica juntamente com o conduto auditivo externo. As peças foram fixadas em formaldeído a 10%, e processados para inclusão em parafina para os procedimentos histológicos. O material foi então seccionado com cortes sempre axiais de 4 $\mu\text{m}$  de espessura. O material foi corado com hematoxilina e eosina, para ser, então, examinada sob microscopia óptica. Concomitantemente, parte do material foi acondicionado em solução salina a 0,85%, e posteriormente seccionados para preparação de lâminas usando solução aquosa a 20% de Hidróxido de Potássio-KOH, e ainda fragmentos do material biológico inoculado em Sabouraud Dextrose Agar para obtenção de retrocultivo (SANTOS *et al.*, 2005).

Após o retrocultivo, a cultura foi novamente identificada para confirmação do agente causador da otomicose experimental.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 MORFOLOGIA DA ORELHA

A orelha é composta pelas regiões externa, média e interna. A externa e a média constituem o chamado aparelho de transmissão, as quais, por meio de vibrações mecânicas, conduzem a energia sonora até a orelha interna. A orelha interna, o aparelho de percepção, transforma essas vibrações em impulsos elétricos, e os converge ao sistema nervoso central (MENEZES; CALDAS NETO; MOTTA, 2005).

A orelha externa abrange o pavilhão auricular, conduto auditivo externo e membrana timpânica. O pavilhão é formado por uma lâmina de cartilagem elástica revestida por pele. Um prolongamento medial dessa cartilagem se afunila em direção à porção anterior, que forma o meato acústico externo, onde se localiza o conduto auditivo externo (CAE) (MENEZES; CALDAS NETO; MOTTA, 2005; SNELL, 1999).

O conduto auditivo externo é formado por um esqueleto cartilaginoso, revestido por uma camada de pele pobre em tecido celular subcutâneo e apresenta várias irregularidades anatômicas, comuns em todos os indivíduos, que tem importância no direcionamento do som para o meato. Este apresenta um estreitamento no seu terço médio, o que dificulta a visão da membrana timpânica à otoscopia, devido à inclinação no sentido anterior (DI DIO, 2002; SNELL, 1999).

Tal estrutura pode ser dividida em um terço externo (porção lateral), na qual o esqueleto é cartilaginoso, e dois terços internos (porção medial), onde o esqueleto é ósseo. No terço externo, a pele é mais espessa, sendo provida de glândulas sebáceas e ceruminosas, sendo estas últimas, glândulas sudoríparas modificadas. Ao produto de secreção dos dois tipos glandulares do conduto dá-se o nome de cerúmen, que, assim como os pelos do conduto, têm função protetora (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; DI DIO, 2002). Já a porção interna, a pele é extremamente fina, com tecido subcutâneo muito escasso, e repousa quase que diretamente sobre o periósteo. A membrana timpânica sela este conduto medialmente, separando-o da orelha média (MENEZES; CALDAS NETO; MOTTA, 2005; DI DIO, 2002).

A orelha média consiste em um espaço chamado de cavidade timpânica, contendo ar, localizado no osso temporal e é revestido por túnica mucosa (DI DIO, 2002). O osso está localizado na região lateral do crânio e pode ser dividido em cinco

partes: escamosa, petrosa, timpânica, estilóidea e mastóidea. Em sua porção mastóidea, encontram-se inúmeras cavidades aeradas, as células mastóideas (DI DIO, 2002), que se apresentam como uma série de cavidades preenchidas por ar, que são revestidas com túnica mucosa, que se interconectam e emergem como um divertículo da cavidade timpânica a partir do antro mastóide (SETHI *et al.*, 2006). Diversas funções estão associadas a estas cavidades, sendo relatadas: recepção de som, isolamento acústico, proteção das estruturas auditivas contra violência externa, redução do peso do crânio e reservatório aéreo da orelha média (SETHI *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2005).

Na cavidade timpânica contém os ossículos da audição cuja função é transmitir as vibrações da membrana do tímpano para a perilinfa da orelha interna. Essa cavidade se comunica com a parte nasal da faringe pela tuba auditiva, e com o antro mastóideo. A tuba auditiva tem a função de equilibrar as pressões do ar na cavidade timpânica e na parte nasal da faringe (SNELL, 1999).

A última região é a chamada orelha interna, que corresponde ao aparelho vestibulo-coclear, situado na parte rígida do osso temporal. Este órgão consiste em espaços cheios de líquido, o labirinto ósseo e o labirinto membranoso, os quais estão envolvidos na recepção do som e na manutenção do equilíbrio (SNELL, 1999; MOORE; AGUR, 1998).

O labirinto ósseo é constituído pelo vestíbulo, canais semicirculares e a cóclea. Estas cavidades estão situadas na substância densa do osso e contêm um líquido claro, a perilinfa, no qual fica suspenso o labirinto membranoso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; DI DIO, 2002). Já o labirinto membranoso, parte essencial dos órgãos da orelha e do equilíbrio, está alojado dentro do labirinto ósseo envolvido pela perilinfa. É uma vesícula fechada, contendo um conjunto de cavidades intercomunicantes e um líquido claro, a endolinfa. A parede do labirinto é revestida por epitélio e em determinadas áreas apresenta células sensitivas e expansões terminais do nervo vestibulo-coclear. Esse labirinto está localizado no interior de escavações no osso temporal (DI DIO, 2002).

A disfunção de tais estruturas da orelha, pode torná-la alvo de infecções por micro-organismos (ROBERT SANDER *et al.*, 2001), sendo denominadas de otomicose aquelas causadas por fungos que acometem, principalmente, o conduto auditivo externo (HAWKE *et al.*, 1997).

## 2.2 OTOMICOSE

Otomiose é uma infecção aguda, subaguda ou crônica caracterizada principalmente por inflamação exsudativa e prurido do conduto auditivo externo (CAE). Além do comprometimento do canal auditivo externo, a doença pode acometer a orelha média, caso a membrana timpânica apresente-se perfurada (MUNGUIA; DANIEL, 2008), ou até mesmo, em alguns casos mais graves, a orelha interna (ABOULMAKARIM *et al.*, 2010).

Nos casos de otite externa fúngica, as principais manifestações clínicas podem ser prurido, edema e hiperemia, caracterizado por inflamação exsudativa com otorreia, além de otalgia (SIH, 2005).

Contudo, um dos acometimentos clínicos mais frequentes, e que está relacionado com a maior frequência residual da doença, é a otite média crônica, caracterizada clinicamente como uma condição inflamatória associada a perfurações amplas e persistentes da membrana timpânica, além de otorreia. O principal sintoma apresentado pelos pacientes acometidos é a otorreia intermitente, normalmente associada a episódios de infecção de via aérea superior e infecção, indolor e inodora, inicialmente, acompanhada de perda auditiva (COSTA; COSTA, 2002). Pelo fato de o processo inflamatório ser exsudativo, torna o canal auditivo suscetível à infecção fúngica, principalmente por fungos que fazem parte da microbiota do canal auditivo externo saudável.

Já o acometimento da orelha interna ocorre, principalmente, em pacientes imunocomprometidos. O processo invasivo pode levar a um quadro de osteomielite com paralisia progressiva do nervo craniano e pode resultar em comprometimento neurológico (PARIZE; CHANDESRIS; LANTERNIER, *et al.*, 2008).

### 2.2.1 Agentes etiológicos

Otomiose tem distribuição mundial e, estima-se que aproximadamente 10 a 25% do total dos casos de otite externa são devido aos fungos (GARCIA-AGUDO *et al.*, 2011; KAZEMI; GHIAEI, 2005).

Pode-se encontrar otite externa micótica isolada ou associada à infecção bacteriana (*Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*), fato que

corresponde à grande maioria das ocorrências (NEMATÍ *et al.*, 2013; SOCIEDADE BRASILEIRA DE OTORRINOLARINGOLOGIA, 2003).

KAUR *et al.* (2000) trabalhando com 95 pacientes com diagnóstico clínico de otite fúngica, confirmaram o envolvimento de fungos em 73 amostras, sendo os patógenos mais comuns *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* e *C. albicans*. Outros autores também destacam *A. flavus* (BARATÍ *et al.*, 2011), *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. e *Scopulariopsis* sp. como patógenos de otomicose.

MARÍN *et al.* (2000), afirmam que a otomicose é um problema clínico comum em Cadiz na Espanha, representando até 25% das otites externas, sendo este um problema persistente, devido as condições climáticas, quente e úmido. Dos 256 pacientes com diagnóstico clínico de otomicose, em 235 (91,8%) casos foram isolados fungos confirmando o diagnóstico clínico. Destes, 91 (35,5%) foram causados por *Aspergillus* sp. *A. flavus* (54,9%) e *A. niger* (23,1%) foram às espécies mais frequentes, enquanto *A. fumigatus* (11,0%), *A. terreus* (5,5%), *A. candidus* (3,3%) e *A. tamarii* (2,2%) foram isolados ocasionalmente.

OZCAN *et al.* (2003a) diagnosticaram otites em amostras clínicas de 87 pacientes atendidos no setor de otorrinolaringologia em hospital na Turquia. Destes, 58 pacientes foram diagnosticados com otite fúngica. A maioria dos pacientes foi atendida no verão e no outono, quando o tempo é quente e úmido. De 63 amostras clínicas foram isolados 67 micro-organismos, além da visualização ao exame direto, do material, observado estruturas fúngicas e *A. niger* o isolado mais frequente (44,8%).

OZCAN *et al.* (2003b) em outro trabalho envolvendo otomicoses e dermatomicoses, demonstraram a obtenção de 61 culturas de fungos em amostras clínicas de 57 orelhas. O principal agente foi *A. niger* seguido de outros como *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. kefyr*. A associação de dois tipos de micoses foi verificada em 19 dos 52 pacientes que teve *C. albicans* (31,6%) como isolado mais comum. Além destes agentes ainda citaram

OZCAN *et al.* (2003b) relataram que os agentes *Tinea rubrum* e *Epidermofiton floccosum* como causadores de otite externa em pacientes imunocompetentes. Os pacientes relataram história de muitos anos de micose em diferentes partes do corpo. Desta forma, como canal auditivo externo é coberto por epitélio escamoso queratinizado, estas lesões podem ser causadas por este grupo de fungo que se localizam mais frequentemente no pavilhão auricular, e raramente no canal auditivo

ou da membrana timpânica. Estes fungos tornam a pele seca e escamosa, causando coceira e eczema, tornando o ambiente propício à infecção.

VENNEWALD, SCHONLEBE e KLEMM (2003) examinaram 128 pacientes com suspeita de otomicose, destes, 115 acometidos por otite média crônica persistindo a perfuração timpânica. Na microscopia direta foram observadas hifas septadas, raramente com estruturas reprodutivas (conidióforo), nos casos em que o agente foi um fungo filamentoso. Nos casos envolvendo leveduras, foram observadas células e pseudomicélio. Verificaram que espécies de *Aspergillus* são os fungos mais comumente identificados em otomicose, e representaram 95% dos fungos isolados. O mais frequente foi *A. niger*, seguido por *A. fumigatus* e *A. flavus*. Outros isolados obtidos foram *A. terreus*, *A. candidus*, *A. hollandicus*, *A. alliaceus*, *A. janus*, *A. versicolor*, *A. nidulans*, *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii* e *Rhodotorula rubra*.

BHALLY *et al.* (2004), nos Estados Unidos, verificaram o envolvimento de *Scedosporium apiospermum*, fungo sapróbio, pouco frequente, mas importante patógeno humano emergente, principalmente em pacientes imunossuprimidos. Este fungo foi agente etiológico de otomicose secundária em uma criança imunocompetente de oito anos submetida à miringotomias e ao uso de tubos de ventilação, além do tratamento com antibióticos. O paciente do sexo masculino retornou com queixa de otorreia, a qual iniciou há duas semanas. Foi realizada novamente miringotomia bilateral e, retiraram-se detritos, dos quais foram realizados exames laboratoriais. Após quatro dias, em meio ágar Sabouraud dextrose, cresceu colônia de fungo, sendo este identificado no estudo micromorfológico como *S. apiospermum* causando infecção em imunocompetente. O caso foi bastante discutido, pois infecção por este fungo como agente de otomicose tem maior frequência em pacientes imunossuprimidos.

Na Índia, MISHRA, MEHTA e PAL (2004), identificaram *A. niger* como a causa da otomicose bilateral crônica. Relataram um caso de uma paciente imunocompetente de 46 anos que não respondia a tratamentos anteriores. A paciente apresentava sinais de eritema, otalgia, otorreia, prurido e presença de massa de cor preta acinzentada em ambos os canais auditivos. O exame direto de fragmentos clarificados com solução de hidróxido de potássio, além de coloração com Gram, revelou hifas septadas, ramificadas, conídios e conidióforos típicos de *Aspergillus* sp. O exame

histopatológico do material coletado corado por Hematoxilina e eosina também revelaram elementos fúngicos.

Segundo YAVO *et al.* (2004) os agentes etiológicos mais comuns no trabalho realizado na Costa do Marfim foram *A. flavus* (20,4%), *C. albicans* (16,3%), *C. parapsilosis* (14,3%) e *A. niger* (12,2%); entretanto, Kaieda (2008) mostra que em seu estudo no Japão, *A. terreus* foi o patógeno mais comum de otomicose, seguido por *A. niger* e *A. flavus*.

No trabalho realizado por ARAIZA, CANSECO e BONIFAZ (2006), em 97 pacientes com otomicose comprovada por exames clínico e micológico, foi constatado a relevância do gênero *Aspergillus* (63,9%), dos quais *A. flavus* foi o mais frequente (26%), seguido por *C. albicans* (26,8%) e *A. niger* (21%). A maioria dos casos foi de otite unilateral (90,7%) e os principais fatores predisponentes associados com a doença foram trauma, devido ao ato de coçar, e o uso de antibióticos tópicos.

Na Paraíba, PONTES *et al.* (2009), em estudo retrospectivo, de 2000 a 2006, examinaram 103 pacientes atendidos com suspeita clínica de otite externa, encaminhados para diagnóstico micológico através de exame direto e cultura. O material clínico foi obtido através de *swabs* esterilizados, processados para exame direto com adição de hidróxido de potássio a 20%, e semeado em placa de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose. Em 19,4% dos pacientes o diagnóstico clínico de otomicose foi confirmado pela presença de estruturas fúngicas com obtenção do agente etiológico. Foram identificadas *C. albicans* (30%), *C. parapsilosis* (20%), *A. niger* (20%), *A. flavus* (10%), *A. fumigatus* (5%), *C. tropicalis* (5%), *Trichosporon asahii* (5%) e *S. apiospermum* (5%).

Na Turquia, YENISEHIRLI *et al.* (2009), entre maio de 2003 e abril de 2007, coletaram amostras clínicas de 92 pacientes com suspeita de otomicose com *swabs* esterilizados e encaminhado para exame laboratorial direto e cultura semeado, em duplicata, em placa de Petri contendo o meio ágar Sabouraud dextrose adicionado cloranfenicol, incubadas a 25°C e 37°C por 14 dias. Foram obtidos 96 isolados, sendo o patógeno mais frequente *A. fumigatus* (40,6%), seguido de *A. niger* (35,4%), *A. flavus* (12,5%) e *C. albicans* (11,5%).

ANEJA, SHARMA e JOSHI (2010) coletaram amostras clínicas de 118 pacientes, com suspeita clínica de otomicose, em Haryana, na Índia, entre janeiro de 2008 e março de 2009. A idade dos pacientes variou de 6 a 75 anos, sendo o maior número de casos constatado em pacientes com idade entre 31 e 40 anos. As

principais queixas eram prurido (72%), otalgia (62%), hipoacusia (57%), plenitude auricular (54%), otorreia (31%) e zumbido (27%). Foram obtidas amostras de detritos e exsudado coletados com *swab* e alça esterilizados, levados ao laboratório de Micologia e processado para exame direto, com solução KOH a 10%, e cultura semeada em três meios: ágar Sabouraud dextrose adicionado de cloranfenicol, ágar Czapek Dox e ágar malte levedura, e incubados a 25°C e 37°C durante duas semanas. Foram isoladas espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Candida* e *Penicillium*, sendo *A. niger* (39,8%) o patógeno mais frequente, seguido de *A. flavus* (16,6%), *A. fumigatus*, *A. luchuensis* e *C. albicans*.

JIA *et al.* (2011), na China, verificaram que os agentes etiológicos mais frequentes da otomicose foram espécies de *Aspergillus niger* (54,78 %), seguida por *Candida albicans* (16,52 %).

Desta forma, de acordo com os relatos dos autores, os agentes etiológicos da otite externa fúngica podem variar nas diversas regiões do mundo. Contudo, os estudos também demonstraram que os patógenos mais comuns no acometimento da otomicose, são espécies do gênero *Aspergillus*, sendo a mais frequente, *A. niger*.

### **2.2.2 Fatores que predispõe a otite externa fúngica**

Nos últimos anos, infecções oportunistas causadas por fungos tem tido uma grande importância na medicina devido, principalmente, ao aumento do número de pacientes com comprometimento da imunidade. No entanto, muitos fungos considerados oportunistas tem sido relatados como capazes de causar infecções em pacientes imunocompetentes (CARNEY, 2008). Portanto, além de fatores que alteram a imunidade, outras condições da orelha como disfunção, condições temporárias ou permanentes, traumas e perfuração da membrana timpânica ou até mesmo doenças e infecções podem favorecer ao acometimento fúngico.

STERN e LUCENTE (2008) relataram que fatores endógenos como anemia, hipovitaminoses, distúrbios endócrinos, principalmente Diabetes mellitus, linfoma, transplantados, recebendo quimioterapia, radioterapia e pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), e várias formas de dermatite como seborreia, psoríase e eczema podem diminuir a resistência a infecções no conduto auditivo externo, aumentando o risco de desenvolver otite externa com complicações potenciais de otomicose.

No entanto, a falha nos mecanismos defensivos, alteração do epitélio de revestimento, mudanças de pH, modificação qualitativa e quantitativa do cerume, presença de infecção bacteriana, o uso de aparelhos de amplificação sonora individual ou prótese auditiva, trauma autoinduzido, natação, antibioticoterapia de amplo espectro, uso de corticoides, neoplasias, alterações imunitárias ou enfermidades debilitantes também podem tornar o hospedeiro susceptível ao desenvolvimento da otomicose (JACKMAN *et al.*, 2005; SIH, 2005).

Contudo, a própria estrutura original do conduto auditivo externo, segundo ROBERT SANDER *et al.* (2001), contribui para o desenvolvimento de otite externa. O canal é escuro, quente e propenso a tornar-se úmido, sendo assim um excelente ambiente para o crescimento de bactérias e fungos. Além disso, com uso de dispositivos para higienização, o CAE pode ser facilmente traumatizado e a eliminação de detritos, secreções e corpos estranhos é dificultada, o que impede a migração de pele e o cerume tende a acumular-se provocando otites externas (SAFFER; BELLIZIA NETO, 2006).

Portanto, a orelha também pode ser acometida em indivíduos saudáveis quando o epitélio do canal auditivo externo é danificado, podendo contribuir para ocorrer otite externa, pois, lesões descamativas do conduto auditivo facilitam a colonização secundária do fungo, rompendo a integridade da pele e a manutenção das secreções protetoras, e assim, abrindo portas de entrada para infecções (SAFFER, BELLIZIA NETO, 2006). JIA *et al.* (2012), afirmaram que o hábito de coçar do canal auditivo externo, foi o fator predisponente mais frequente (79,63 %) em sua pesquisa. SARVAN *et al.* (2012), também mostraram que o principal fator predisponente relacionado com a doença foi a auto limpeza inadequada 55 (64%), seguido por trauma menor (23%).

As lesões também podem ocorrer tanto na orelha externa quanto na média, bem como em cavidades pós-operatórias, e podem criar condições favoráveis para o crescimento de fungos e posterior otomicose (VENNEWALD; SCHONLEBE; KLEMM, 2003; KURNATOWSKI; KILIPAK, 2001; NWABUISI; OLOGE, 2001; KAUR *et al.*, 2000). A otomicose é muito frequente nos casos de otorreia crônica e em orelhas submetidas à mastoidectomias amplas, com grandes cavidades (SOCIEDADE BRASILEIRA DE OTORRINOLARINGOLOGIA, 2003). HO *et al.* (2006) afirmam que a presença de uma cavidade mastoidea, que é uma região da orelha média em que consiste em inúmeras cavidades aeradas, as células mastóideas, que se apresentam

como uma série de cavidades preenchidas por ar, está associada com altas taxas de recorrência residual da doença. A infecção fúngica da orelha também pode ocorrer em pacientes com otite média crônica com persistente perfuração da membrana timpânica e otorreia com ou sem colesteatoma (VENNEWALD; SCHONLEBE; KLEMM, 2003). Os colesteatomas são caracterizados pela proliferação anormal de células do epitélio escamoso, resultando em acúmulo de queratina, destruição do arcabouço ósseo adjacente, podendo deste modo invadir e comprometer estruturas nobres, como a orelha interna, nervo facial e sistema nervoso central (TESTA *et al.*, 2003). A maioria desses pacientes não são neutropênicos ou imunocomprometidos, mas têm otite média crônica por muitos anos. Estes pacientes têm, em longo prazo, reincidência de otorreia e tratados repetidamente com antibióticos, sem remissão de sintomas. Apresentam também colonização fúngica crônica do canal auditivo (VENNEWALD; SCHONLEBE; KLEMM, 2003). Os pacientes imunossuprimidos podem desenvolver infecção aguda invasiva fatal ou forma crônica invasiva (BELLINI *et al.*, 2003).

Outro a fator corresponde à prática de mergulhar. Os mergulhadores, surfistas e outros que tem experiência de compressão vigorosa da membrana timpânica são particularmente susceptíveis a perfuração timpânica e ocorrência de otomicose (NICHOLS, 1999). Trabalho realizado na Costa do Marfim por YAVO *et al.* (2004), mostrou que nadar frequentemente em piscinas naturais ou artificiais, fazer limpeza diária da orelha e o uso excessivo de gotas otológicas contendo antibióticos e corticoides são fatores de risco para otomicose. Portanto, pacientes com otite média crônica com drenagem ativa devem evitar nadar, pois, o calor, a umidade e a água podem causar inchaço do estrato córnea da pele e a umidade do banho aumenta a maceração da pele do canal auditivo que leva à destruição da barreira protetora, química e mecânica, do cerume e cria condições adequadas para bactérias e fungos, além disso, essas mudanças também podem causar coceira no canal auditivo externo, assim acrescentando a possibilidade de arranhões e posterior infecção (HO *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2005), uma vez que, o cerume é rico em lipídios (substância hidrofóbica) que impede a penetração de água, evitando assim a maceração da pele (ROBERT SANDER, 2001).

Segundo KUMAR (2005), condições de higiene e questões culturais também são fatores de risco para otomicose. Estudo realizado na Índia, concluiu que ambiente úmido, falta de higiene, uso de turbante e véu, e condições climáticas são os principais

fatores predisponentes para o desenvolvimento de otomicose. O maior número de casos clínicos são detectados durante a estação chuvosa em comparação com os meses de verão devido à umidade, pois esta é uma condição favorável para o crescimento fúngico.

Além destes fatores, otites bacterianas, terapia tópica com corticosteroides, são fatores que predispõe a otomicose. OZCAN *et al.* (2003a), afirmaram que a infecção primária bacteriana foi um dos mais comuns fatores predisponentes em seus pacientes com acompanhamento prévio de 1 a 4 meses de duração de antibioticoterapia. ARAIZA *et al.* (2006) e MUNGUIA e DANIEL (2008), concordam que houve um aumento na prevalência de otomicose nos últimos anos associado ao uso tópico extensivo de antibiótico. Em 2009, PONTES *et al.*, também afirmaram que além da antibioticoterapia, foi o fator predisponente mais presente em seu trabalho.

Outro fator, segundo AHMAD *et al.* (2007) é o uso de aparelhos auditivos. A utilização destes tem sido apontada como um fator predisponente para o desenvolvimento de otite externa crônica (AHMAD *et al.*, 2007; BANKAITIS, 2005). Os dispositivos de amplificação sonora foram identificados como uma potencial fonte de transmissão de micro-organismos.

Em longo prazo, o uso de prótese auditiva é um fator para a colonização de fungos, sendo que está colonização e pode resultar em níveis suficientemente altos para dar lugar a otomicose (STURGULEWSKI *et al.*, 2006).

### **2.2.3 Manifestações clínicas e sintomas**

Os sintomas apresentados pelos portadores de otomicose podem ser os mais diversos e, em alguns casos, são poucos evidentes, sendo necessária uma otoscopia. Contudo, na maioria dos casos, o paciente queixa-se de surdez, prurido, zumbido e otorreia aquosa (LACAZ *et al.*, 2002).

A apresentação clínica inicial é semelhante à otite externa bacteriana, mas a suspeita de infecção por fungos pode ocorrer quando o paciente não responde ao tratamento com antibióticos (JACKMAN *et al.*, 2005).

A infecção primária também pode resultar da nasofaringe através da tuba auditiva por leveduras e bactérias. Infecção por fungos filamentosos, ao contrário das bactérias e leveduras, só é possível após perfuração do tímpano (VENNEWALD; SCHONLEBE; KLEMM, 2003; BORKOWSKI, 2000).

Os principais sintomas característicos das diversas formas de otite externa podem incluir a otalgia, corrimento (otorreia), prurido, a sensação de plenitude auricular (“orelha cheia”), a diminuição da audição (hipoacusia) quando fragmentos de hifas fúngicas e restos epiteliais obstruem o canal auditivo, descamação do epitélio do canal auditivo, inflamação, sensação de queimação, vertigem, zumbido, dor de cabeça, vermelhidão do exterior da pele do canal auditivo, acúmulo de massa branca sugestivo de levedurose ou com pontos pretos compatíveis com *A. niger*, espessamento e eritema do canal (alergia ou dermatite de contato), bem como tecido de granulação no canal, causado por infecção crônica (MAHMOUDABADI; MASOOMI; MOHAMMADI, 2010; JACKMAN et al., 2005; SIH, 2005; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Em pacientes gravemente imunossuprimidos e com profunda neutropenia, pode ser observada além dos sintomas citados, erosão extensa do conduto, com invasão fúngica e ocorrência de otite externa necrosante. Persistindo supuração com a maceração do epitélio do conduto pode fazer com que a colonização de fungos na orelha externa de pacientes torne-se otite média (SIDRIM; ROCHA, 2004; VENNEWALD; SCHONLEBE; KLEMM, 2003).

A inflamação crônica da mucosa na orelha média resulta em uma contínua drenagem de fluidos da cavidade da orelha média para o canal auditivo, ocorrendo à perfuração da membrana timpânica, e recidiva de otorreia. A persistência da perfuração do tímpano é uma porta de entrada para a orelha. Nesses casos, as recidivas fúngicas são bastante frequentes (LACAZ et al., 2002).

#### **2.2.4 Diagnóstico**

A otomicose não pode ser diagnosticada com base apenas nos sintomas clínicos (AFSHARI et al., 2005), é necessário também o histórico clínico do paciente, otoscopia sob controle microscópico, preparações das amostras para exame direto, cultura micológica e exame histológico, que são importantes e recomendáveis para o diagnóstico preciso (VENNEWALD; KLEMM, 2010).

Quando há acometimento da orelha média, o método diagnóstico mais importante, além da história clínica, é a avaliação da aparência e mobilidade da membrana timpânica, que inclui a otoscopia (BLUESTONE et al., 2003).

No diagnóstico de otite fúngica é essencial que na suspeita clínica ocorra a solicitação de exame direto e de cultura para identificar os agentes fúngicos responsáveis (ABOULMAKARIM *et al.*, 2010). Em casos mais graves é necessário o exame histopatológico e, estudos radiológicos da cabeça. Além disso, é importante inquirir ao paciente sobre o uso de medicação antifúngica. Caso esteja utilizando esse tipo de medicação, o paciente deve ser orientado para suspendê-la por um período de 15 dias, no caso da medicação de uso tópico, acordada com o médico do paciente (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Além disso, em casos como mastoidite fúngicas invasivas ou meningite, a detecção de antígenos fúngicos em soro e no líquido cefalorraquidiano é benéfica (VENNEWALD; KLEMM, 2010).

#### 2.2.4.1 Coleta de amostras clínicas

A coleta das amostras clínicas é a primeira etapa do diagnóstico laboratorial e deve ser realizada corretamente, sob pena de inutilizar todo o procedimento laboratorial posterior, pois amostras colhidas inadequadamente podem acarretar em resultados falsos.

Antes da coleta do material, é necessário coletar dados como nome, idade, sexo, endereço, ocupação, sintomas, histórico, fatores predisponentes, que devem ser registrados para cada paciente em uma planilha (JADHAV; PAL; MISHRA, 2003).

Para ter acesso ao conduto auditivo externo é necessária a utilização de um otoscópio com o espéculo que, permite a visualização completa do conduto até a membrana timpânica no exame clínico, sendo a coleta do material realizada por profissional capacitado (NOGUEIRA *et al.*, 2008).

Considerando a orelha interna e média regiões estéreis, e a externa contendo microbiota cutânea, antes de coletar é necessário realizar uma limpeza do conduto auditivo com *swab* esterilizado umedecido. Após a limpeza, a coleta deve ser realizada usando *swab*, sendo a secreção transferida para água destilada esterilizada adicionada de 50 mg/L de cloranfenicol contido em tubo; as escamas de pele devem ser coletadas com o auxílio de bisturis. As amostras clínicas são processadas através de exame microscópico direto e cultura. Após a obtenção das amostras clínicas, as mesmas deverão ser analisadas, para o exame direto e cultivo, até duas horas após a coleta (PONTES *et al.*, 2009).

#### 2.2.4.2 Exame direto

O exame laboratorial direto da amostra clínica pode ser realizado a fresco sem clarificante nem corante, em caso de secreção, ou clarificado com solução aquosa de hidróxido de potássio a 20% se o material coletado for cerume ou fragmentos de pele (Sidrim; Rocha, 2004).

Sempre que estruturas fúngicas são detectadas em amostras clínicas do conduto auditivo externo, surge a questão se estas representam colonização ou infecção clinicamente relevante, sendo estas acompanhadas por inflamação (VENNEWALD; SCHONLEBE; KLEMM, 2003).

O exame direto de otomicose é caracterizado pela presença de numerosas hifas longas septadas, hialinas, dicotômicas, bem como hifas escuras, podem ser visíveis em infecções por fungos filamentosos ou células de leveduras, ovais, hialinas isoladas, agrupadas ou com formação de pseudomicélio (ENOZ; SEVINC; LAPEÑA, 2009; JACKMAN et al., 2005).

#### 2.2.4.3 Obtenção da cultura

Paralelamente ao exame direto, as amostras são semeadas na superfície de meios de cultura para isolamento e identificação do agente etiológico (ENOZ; SEVINC; LAPEÑA, 2009).

As amostras do conduto auditivo devem conter detritos e secreções que podem ser usados para cultura micológica (VENNEWALD; KLEMM, 2010). A obtenção da cultura é importante, pois, confirma a presença de estruturas do microrganismo observado ao exame direto (LACAZ *et al.*, 2002).

Como a otomicose pode ser causada por fungos oportunistas, a interpretação do isolamento destes fungos deve ser cuidadosa. Deve-se observar se houve crescimento de várias colônias do mesmo fungo na mesma placa referente ao isolamento primário (LACAZ *et al.*, 2002).

Após a coleta, o material clínico coletado deve ser semeado em duplicata, quando for secreção, ou inoculado em pontos, quando se tratar de fragmentos, em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol, incubadas a 25°C e a 37°C com observação semanal durante 30 dias.

Após a obtenção da cultura é necessário purificá-la para identificação (PONTES *et al.*, 2009).

Na purificação das amostras de fungos, os fragmentos das colônias são suspensos em água destilada esterilizada adicionada de 50 mg/L de cloranfenicol e semeados, em estria, em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose suplementado com 50 mg/L de cloranfenicol (LACAZ *et al.*, 2002). Após confirmação da pureza, as colônias serão transferidas para tubos de ensaio contendo meios específicos, de acordo com o grupo do fungo a ser identificado.

#### 2.2.4.4 Histopatológico

O exame laboratorial também inclui o histopatológico (VENNEWALD; KLEMM, 2010), no entanto, na rotina, muitas vezes não é possível um exame histopatológico. As amostras da pele, de material cirúrgico da membrana timpânica obtidas por biópsia, corados com a técnica hematoxilina e eosina, e da cavidade da orelha média podem ser utilizados para fins histopatológicos (JADHAV; PAL; MISHRA, 2003).

No exame histológico são observadas as mesmas estruturas fúngicas constatadas ao exame direto micológico, bem como o tipo de reação inflamatória (VENNEWALD; KLEMM, 2010).

#### 2.2.4.5 Identificação dos agentes etiológicos

A identificação é realizada através das características macroscópicas, microscópicas e, quando necessário, fisiológicas (LESLIE; SUMMERELL, 2006; SAMSON; FRISVAD, 2004; KLICH, 2002; BARNETT *et al.*, 2000; DE HOOG *et al.*, 2000; DOMSCH *et al.*, 1993; PITT, 1988; ELLIS, 1971; RAPER; FENNELL, 1965).

Morfologicamente são analisadas diferentes características macroscópicas como diâmetro, bordos, textura e coloração do verso e reverso das colônias, produção de pigmentos e tempo de crescimento. A verificação das microestruturas somáticas e reprodutivas pode ser realizada pela técnica de DALMAU (1929), através de microcultivos (cultivo sob lamínula), onde fragmentos das colônias serão semeados em dois pontos equidistantes da placa contendo o meio de cultura específico para cada grupo de fungos, e sobre estes colocadas lamínulas previamente esterilizadas.

A preparação permanece a temperatura de 28°C por aproximadamente sete a 15 dias conforme espécie em estudo. Em seguida, a lamínula do cultivo é retirada, invertida e colocada sobre uma lâmina de vidro, contendo uma 40 µL de Azul de Amann (CARRANZA, 1949), para posterior observação microscópica de estruturas somáticas e reprodutivas.

As análises fisiológicas e bioquímicas são realizadas através de testes quanto à fermentação pela utilização de compostos de carbono, assimilação pela utilização de compostos de carbono e nitrogênio (BARNETT *et al.*, 2000; DE HOOG *et al.*, 2000), produção de urease (LACAZ *et al.*, 2002) e produção de ácido acético (BARNETT *et al.*, 2000).

### **2.2.5 Fatores de patogenicidade dos agentes da otomicose**

A patogenicidade de um micro-organismo é a capacidade do mesmo determinar uma doença em um hospedeiro, mediada por diversos fatores. Apesar de algumas características serem determinadas geneticamente, elas são expressas pelos micro-organismos apenas quando existem condições que favorecem, tais como o teor nutricional, a atmosfera de oxigênio e a temperatura. Tais condições são específicas para cada agente etiológico, e podem variar entre hospedeiros, e em diferentes tecidos de um mesmo hospedeiro (GHANNOUM; RADWAN, 1990).

Existem algumas propriedades ligadas às células de *C. albicans*, por exemplo, comumente denominadas fatores de virulência, que lhes conferem a capacidade de produzir uma doença, como a formação de tubo germinativo com consequente desenvolvimento da forma filamentosa; a variabilidade fenotípica (*Switching* fenotípico) e genotípica; a produção de toxinas, variabilidade antigênica, imunomodulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, a hidrofobicidade de superfície celular, além da produção de enzimas extracelulares hidrolíticas e a adesão à substratos inertes e biológicos, os constituem os principais fatores para o desencadeamento de infecções (CALDERONE; FONZI, 2001; CHAKRABARTI; NAVAK; TALWAR, 1991; GHANNOUM; RADWAN, 1990).

A produção de exoenzimas, como lipases, fosfolipases e proteinases exercem papel importante na invasão da célula do hospedeiro pelo patógeno (BARRET-BEE *et al.*, 1985; POLAK, 1992). As fosfolipases, por exemplo, concentram-se nas pontas das hifas e a atividade de produção é maior quando a hifa está em contato direto com

a membrana, o que sugere que essas enzimas são importantes na invasão tecidual por *C. albicans* (GHANNOUM; ABU-ELTEEN, 1990; NIEWERTH; KORTING, 2001).

No entanto, a adesão é considerada o primeiro passo no estabelecimento de infecções fúngicas (BUSSCHER *et al.*, 2010; RAMAGE; MARTINEZ; LOPEZ-RIBOT, 2006), sendo a interação destes patógenos à superfície de células eucarióticas mediada por macromoléculas designadas adesinas, as quais interagem com receptores específicos das células eucarióticas. (FINLAY; FALKOW, 1989).

Estudos com *Aspergillus fumigatus*, demonstraram que a fixação do conídio ao epitélio ou à membrana basal subepitelial pulmonar é essencial para a colonização e invasão fúngica ao tecido. A fixação no tecido hospedeiro é mediada por receptores para o fibrinogênio e/ou laminina, presentes na superfície do conídio (ROILIDES *et al.*, 1998; BROMLEY; DONALDSON, 1996). O fibrinogênio é uma das principais proteínas plasmáticas envolvidas nas respostas inflamatórias e sua deposição no epitélio pulmonar forma sítio de ligação para os receptores nos conídios e posterior colonização (ROILIDES *et al.*, 1998; ANNAIX *et al.*, 1992; COULOT *et al.*, 1994). Assim, a aderência entre o micro-organismo invasor e o tecido do hospedeiro requer o estabelecimento de ligações específicas entre estruturas complementares existentes na superfície do patógeno e da célula epitelial (GHANNOUM; RADWAN, 1990).

Contudo, a aderência de um micro-organismo também pode ser avaliada de acordo com a capacidade de o micro-organismo formar biofilmes, os quais constituem agregados celulares que aderem à superfície. Sua formação ocorre em resposta a uma variedade de condições como alta densidade celular, privação de nutrientes e estresse física ambiental (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000).

#### 2.2.5.1 Perfil de carboidratos da parede celular fúngica

A interação entre um fungo e o hospedeiro ocorre primeiramente a nível de parede celular (CALDERONE, 1993). A parede celular contém moléculas envolvidas na morfogênese, reprodução e interações célula-célula e célula-matriz. Embora seja uma estrutura rígida, é dinâmica permitindo o brotamento, crescimento e adaptação ao estresse ambiental (KLUTTS *et al.*, 2006). Esta estrutura é composta por polissacarídeos incluindo quitina e uma variedade de glicanos. No entanto, a

composição da parede da célula pode ser diferente substancialmente entre as espécies fúngicas (PINTO; BARRETO-BERGTER; TABORDA, 2008).

Segundo López-Ribot *et al.* (2004), as proteínas e glicoproteínas expostas nas camadas mais externas da parede celular estão envolvidas em vários tipos de interações entre o fungo e o ambiente, sendo lectinas, instrumentos para o reconhecimento.

Assim, as lectinas são proteínas ligantes de carboidratos, de origem não imune, aglutinantes de células e glicoconjugados, com capacidade de reconhecimentos específicos e de manter ligações reversíveis com carboidratos e substâncias contendo açúcares, sem alterar a estrutura covalente de alguns ligantes glicosídicos (GOLDSTEIN *et al.*, 1980).

LIMA-NETO *et al.* (2009) avaliaram a expressão de carboidratos de superfície celular de fungos usando testes de ligação com lectinas em isolados clínicos de *C. albicans* e *C. parapsilosis* e indicaram a presença de  $\alpha$ -D - glicose /  $\alpha$ -D - manose, N - acetil - D - glucosamina/ N – acetilneuramínico e ácido D - galactose / N - acetil - D - galactosamina. Segundo estes autores, a aderência de leveduras em células epiteliais bucais humanas é mais intensa para isolados fúngicos com um alto teor de L-fucose na superfície da célula, indicado pelo padrão de coloração UEA-I.

As lectinas possuem a capacidade de se ligarem especificamente a carboidratos da superfície de hifas fúngicas e atuarem impedindo o consumo de nutrientes e a incorporação de precursores necessários para o crescimento do fungo, ou seja, tem ação fungicida (FREIRE, 2003). Atuam ainda sobre a germinação de esporos fúngicos, provavelmente em um estágio muito inicial do processo, inibindo-a, de modo que há um prolongamento do período latente que precede a germinação (LIS; SHARON, 1981).

Lectinas também têm sido usadas com grande sucesso como indicadores de fungos, uma vez que esses compostos são altamente específicos aos carboidratos presentes na parede celular dos mesmos (LEAL *et al.*, 2011a). O conhecimento do perfil sacarídico na superfície fúngica habilita o uso de lectinas como promissoras sondas celulares, que podem servir como carreadores de agentes antifúngicos que utilizam como alvos específicos, os carboidratos existentes na superfície da célula do micro-organismo (LEAL *et al.*, 2011b), além disso, podem auxiliar, por exemplo, na seleção terapêutica, tal como foi proposto para infecções bacterianas (UMAMAHESHWARI; JAIN, 2003).

#### 2.2.5.2 Formação de biofilme por fungos causadores de otomicose

Na investigação micológica observa-se uma mudança de paradigma nos últimos anos, com uma valorização de desenvolvimento dos fungos de importância clínica, em relação a capacidade de formar e sobreviver em comunidades de biofilme (MARTINEZ; FRIES, 2010; RAMAGE *et al.*, 2009; JABRA-RIZK *et al.*, 2004).

Estes micro-organismos podem formar agregados celulares, um modo protegido de crescimento que permite a sobrevivência em ambientes hostis, sendo sua fisiologia e comportamento significativamente diferente das células planctônicas (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Biofilmes fúngicos, são estabelecidos numa superfície após as seguintes fases de desenvolvimento: chegada a um adequado substrato, a adesão, a colonização, a produção de polissacarídeo, a maturação de biofilme e de dispersão (CHANDRA *et al.*, 2001; DONLAN, 2002; BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006).

A adesão e colonização de populações fúngicas complexas em superfícies biológicas e inatas, tais como prótese de acrílico, é comum para fungos clinicamente relevantes (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 1998).

Devido a isso, as infecções relacionadas com biofilme de fungos filamentosos também têm sido cada vez mais descritas (RAMAGE *et al.*, 2009), inclusive por espécies do gênero *Aspergillus* (MOWAT *et al.*, 2009). É cada vez mais claro que uma grande diversidade destes micro-organismos tem a capacidade de formar estes agregados que, clinicamente são importantes, pois, são refratários ao tratamento antifúngico, o que representa um grande problema para os clínicos como a dose necessária para erradicar o biofilme pode exceder o máximo atingível terapêuticamente as concentrações de antibióticos (RASMUSSEN; GIVSKOV, 2006).

Uma das características do biofilme produzido por estes micro-organismos é o aumento da resistência aos agentes antifúngicos. RAMAGE *et al.* (2001), Di BONAVENTURA *et al.* (2006) e TRÉ-HARDY *et al.*, (2008), relataram que biofilmes são até 1000 vezes mais resistentes à antifúngicos do que as células planctônicas.

#### 2.2.6 Terapia antifúngica em casos de otite fúngica

O tratamento adequado para infecção fúngica deve incluir a formulação do fármaco, via de administração, dose, tempo de tratamento de acordo com o local e a

severidade da doença. O tratamento deve ser dirigido especificamente contra o agente da doença com a finalidade de evitar o desenvolvimento de resistência do patógeno. A cura deve ser confirmada por repetidas culturas não obtidas de fungos (VENNEWALD; KLEMM, 2010).

Pacientes com infecções superficiais e colonização crônica devem ser tratados com desbridamento intenso e limpeza combinada com antifúngico tópico (MUNGUIA; DANIEL, 2008; VENNEWALD; SCHONLEBE; KLEMM, 2003).

A medicação de uso tópico é geralmente suficiente para tratar pacientes com otomicose. No entanto, o uso de antifúngicos sistêmicos pode melhorar o resultado da medicação tópica, especialmente em pacientes com doença crônica (VENNEWALD; KLEMM, 2010). Contudo, o tratamento sistêmico deve ser prescrito no caso de otite externa maligna invasiva (aguda ou crônica) com complicações devido a meningite ou mastoidite (VENNEWALD; KLEMM, 2010).

Segundo RUTT e SATALOFF (2008), em pacientes imunocomprometidos, o tratamento da otomicose deve ser persistente para evitar complicações tanto em relação à perda da audição, quanto uma infecção invasiva no osso temporal.

No entanto, a fim de selecionar um tratamento adequado, a identificação correta dos isolados clínicos é essencial, já que nem todas as espécies têm os mesmos padrões de susceptibilidade contra os antifúngicos (NEMATI *et al.*, 2013; AKTAS; YIGIT, 2009; BALAJEE *et al.*, 2007).

Além disso, também é importante identificar o agente etiológico da otomicose para obter informação adequada sobre a relevância clínica de uma determinada espécie, o que também é recomendado para uma escolha de um tratamento adequado (ARTHUR; DREW; PERFECT, 2004).

Muitos antifúngicos têm sido utilizados por otorrinolaringologistas, na busca de um mais eficaz para o tratamento da otomicose.

Os principais medicamentos de uso tópico que estão disponíveis são polienos (nistatina), imidazólicos (cetoconazol e miconazol), piridonas (Ciclopirox olamina) (JACKMAN *et al.*, 2005; VENNEWALD; SCHONLEBE; KLEMM, 2003; DEL PALACIO *et al.*, 2002; KURNATOWSKI; FILIPIAK, 2001). Segundo VISWANATHA, SUMATHA e VIJAYASHREE (2012), Clotrimazol promove o tratamento efetivo da otite fúngica, e fluconazol é uma alternativa para pacientes em que o clotrimazol não foi eficiente.

Para VENNEWALD e KLEMM (2010), os antifúngicos tópicos, tais como clotrimazol, miconazol, bifonazol, ciclopirox olamina, e tolnaftato, são escolhas

seguras para o tratamento de otomicoses, especialmente em pacientes com perfuração da membrana timpânica.

HO *et al.* (2006), apontam que o cetoconazol, um antifúngico azólico com largo espectro de atividade, é eficaz no tratamento dos agentes etiológicos mais comuns da otite fúngica. Em seu trabalho, o cetoconazol mostrou eficácia de 95-100% *in vitro* contra as espécies de *Aspergillus* e *Candida albicans*, em casos de otomicose.

MUNGUIA e DANIEL (2008), também afirmam que azólicos, agentes sintéticos que reduzem a concentração de ergosterol, um esteroide essencial na membrana citoplasmática normal, como o cetoconazol são mais eficazes para o tratamento de otomicoses, e tem baixa toxicidade. No entanto, SZIGETI *et al.* (2012), perceberam que espécies de *Aspergillus awamori* e *A. tubingensis*, isolados de otomicose, foram pouco susceptíveis ao cetoconazol, com concentração inibitória mínima entre 8-16 µg.ml<sup>-1</sup>.

Outras medicações tópicas disponíveis para o tratamento de otomicose relacionadas incluem ciclopirox olamina, pertencente aos grupos das hidroxipiridonas (DEL PALACIO *et al.*, 2002; JUE; DAUSON; BROGDEN, 1985).

O ciclopirox olamina tem sido recentemente objeto de várias investigações que têm elucidado seu mecanismo de ação e eficácia em várias doenças causadas por infecções fúngicas superficiais (SUBISSI *et al.*, 2010).

VENNEWALD e KLEMM (2010) afirmam em seu trabalho que o ciclopirox olamina tem boa atividade *in vitro* contra os dermatófitos, leveduras, fungos filamentosos, bactérias gram-negativas e bactérias gram-positivas, sendo assim, mais amplo do que maioria dos outros antimicóticos. Também é ativo contra certas espécies de *Candida*, as quais são frequentemente resistentes à azólicos (SUBISSI *et al.*, 2010). Outra característica interessante é que o composto possui atividade anti-inflamatória similar à da hidrocortisona, o que é importante em casos de otites infecciosas mistas.

O mecanismo de ação do ciclopirox olamina é diferente de outros antifúngicos tópicos, que geralmente age através da inibição do ergosterol. A alta afinidade desta classe para os cátions de metais trivalentes resulta na inibição das enzimas dependentes de metal que são responsáveis pela degradação dos peróxidos na célula fúngica, esse parece ser o principal determinante da atividade antifúngica. Este mecanismo único e com vários níveis de ação prevê um potencial muito baixo para o desenvolvimento de resistência em fungos (JONES, 2003).

As Normas M38-A2 e M27-A3 da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), método de referência para testes de diluição em caldo para Determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos e leveduras, respectivamente, descreve e padroniza o método para testar a sensibilidade dos fungos que causam infecções invasivas e fungos patogênicos oportunistas, como espécies de *Aspergillus*, a drogas antifúngicas. No entanto, para o uso do ciclopirox olamina, o documento determina o padrão apenas para dermatófitos. Devido a este fato, torna-se necessário o conhecimento do potencial deste fármaco frente a agentes causadores da otomicose, uma vez que, tem-se obtido resultados satisfatórios *in vitro*, na inibição do crescimento fúngico, sendo necessário estudos *in vivo* da capacidade da ação da droga.

### **2.2.7 Modelo experimental da otomicose**

O uso de animais em experimentos é importante na pesquisa otológica e o conhecimento da anatomia de sua orelha, e a semelhança ao homem, permite sua utilização adequada em modelos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009).

EMGARD e HELLSTRÖM (1997), desenvolveram um modelo para avaliar reação inflamatória do conduto auditivo externo (CAE) em ratos. Tal reação foi estimulada mecanicamente com uma micropipeta plástica e alguns aspectos foram avaliados como a cor da pele, inchaço e a presença de fluido do CAE. Os resultados mostraram que este modelo animal para a otite externa pode ser utilizado para investigar patogênese da inflamação, bem como testar várias estratégias de tratamento.

Em 2001, os mesmos autores publicaram um experimento no qual avaliaram o tratamento de inflamações do CAE frente a fármacos anti-inflamatórios, associados ou não a antibióticos. Neste trabalho, os autores inferiram que outras pesquisas devem ser desenvolvidas para avaliar o potencial de novos fármacos frente a micro-organismos. Quatro anos depois, estes autores publicaram modelo de infecção utilizando *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

No entanto, estudos com fungos filamentosos são escassos.

### 3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

#### 3.1 REVISÃO TAXONÔMICA DE FUNGOS ISOLADOS DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE CASOS DE OTOMICOSE DEPOSITADOS NA MICOTECA URM

Dentre os isolados obtidos da Coleção de Cultura Micoteca URM, e quatro ainda não estocados, foram revisadas espécies de *Aspergillus avenaceus* (2), *A. awamori* (1), *A. flavus* (4), *A. fumigatus* (2), *A. niger* (4), *A. niveus* (3), *A. ochraceus* (3), *A. parasiticus* (3), *A. tamarii* (3) e *Candida parapsilosis* (2) (Tabela1).

A revisão taxonômica das espécies de *Aspergillus* foi realizada por meio da avaliação da macro e microscopia. Espécies de *Aspergillus* foram semeados aos meios de cultura específicos, como Czapek (CZ), ágar malte (MEA) e/ou CYA25, e as colônias foram avaliadas com de até sete dias de crescimento, segundo Klich (2002).

Tabela1 - Isolados fúngicos revisados taxonomicamente por meio da morfologia macro e microscópica.

CÓDIGOS	ISOLADOS
URM6321	<i>Aspergillus ochraceus</i>
URM6322	<i>A. tamarii</i>
URM6323	<i>A. parasiticus</i>
URM6324	<i>A. parasiticus</i>
URM6325	<i>A. flavus</i>
URM6326	<i>A. fumigatus</i>
URM6327	<i>A. fumigatus</i>
URM6328	<i>A. awamori</i>
URM6329	<i>A. niger</i>
URM6330	<i>A. niveus</i>
URM6331	<i>A. parasiticus</i>
URM6332	<i>A. flavus</i>
URM6333	<i>A. flavus</i>
URM6334	<i>A. niveus</i>
URM6335	<i>A. niveus</i>
URM6745	<i>A. tamarii</i>

URM6746	<i>A. tamarii</i>
URM6794	<i>A. niger</i>
URM6795	<i>A. niger</i>
URM6796	<i>A. ochraceus</i>
URM6797	<i>A. ochraceus</i>
URM7048	<i>Candida parapsilosis</i>
URM7049	<i>Candida parapsilosis</i>
MM87B/09	<i>A. avenaceus</i>
MM87C/09	<i>A. avenaceus</i>
MM88A/09	<i>A. flavus</i>
MM88C/09	<i>A. niger</i>

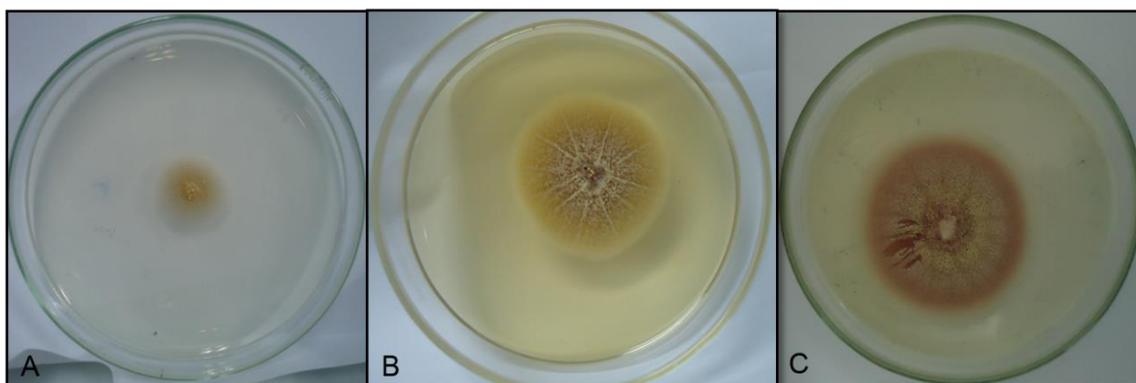
- *Aspergillus ochraceus*

Para a identificação de isolados de *A. ochraceus* foram utilizados os meios de cultura Czapek (CZ) (A), ágar malte (MEA) (B) e CYA 25 (C) (Figura 1).

A coloração dos conídios no meio CYA25 é próxima da cor do trigo (C). Micélio branco e discreto; esclerócio de cor rosa. A colônia é pouco flocosa e formam sulcos.

Quando semeados em CZ, o *A. ochraceus* se comportou semelhante à quando em CYA25. No meio MEA, o conídio apresentou-se pouco denso e na coloração amarelo claro a amarelo âmbar. Da mesma forma que no meio CYA25, o micélio é discreto, e o reverso apresentou-se amarelo. As colônias, nos três meios de cultura, esporularam de forma pouco densa.

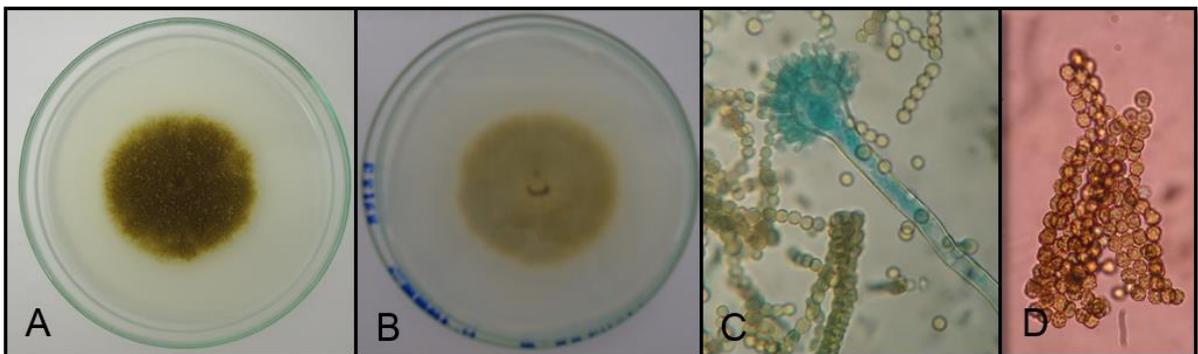
Figura 1 - Características da macroscópicas de *Aspergillus ochraceus* quando semeados nos meios de cultura CZ (A), MEA (B) e CYA25 (C).



- *Aspergillus tamarii*

A colônia de *A. tamarii* se apresentou com textura plana, coloração verde-oliva amarronzada (A), reverso incolor a amarelo-acinzentado (B); vesículas globosas a piriformes; uni e bisseriados e fiáldes cobrindo toda a superfície da vesícula (C) e conídios globosos (D), em meio de cultura ágar Czapek com cinco dias de crescimento, como mostra a Figura 2.

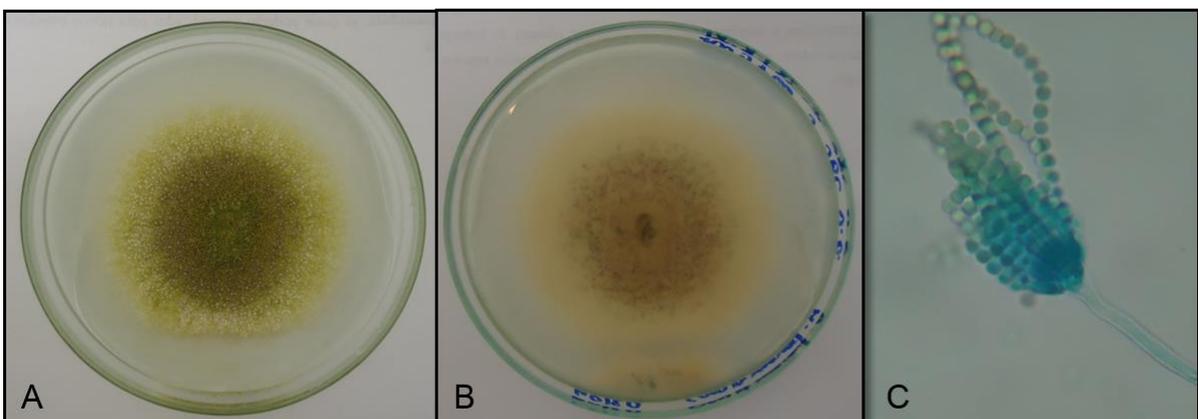
Figura 2 – Macroscopia de *A. tamarii*: colônia com textura plana, coloração verde-oliva amarronzada (A), reverso incolor a amarelo-acinzentado (B); na microscopia, vesícula globosa (C), conídios globosos (D) em ágar Czapek.



- *Aspergillus parasiticus*

A colônia apresentou-se com conídios verde oliva, micélio branco, esclerócio marrom, colônia com micélio bastante baixo (A). Reverso incolor, pouco amarelo (B); Apresentaram cabeças conidiais radiais, vesículas esféricas e predominantemente unisseriados. O conídio é globoso com parede enrugada (C). (Figura 3)

Figura 3 – Aspectos morfológicos de *Aspergillus parasiticus*. Macroscopia verso (A), reverso (B) e microscopia (C), apresentando uma colônia em meio Czapek.



- *Aspergillus flavus*

*A. flavus*, após semeado em meio ágar Czapek, produziu conídios verde escuros, micélio branco inconspícuo, esclerócio marrom a preto de diferentes formas e tamanhos. O reverso amarelo mais escuro e no centro da colônia com textura flocosa. A cabeça conidial radiada a colunar; vesículas esféricas a alongadas com seriação variada. Os conídios apresentaram-se de forma globosas e paredes suavemente enrugadas a lisas, característica a qual o diferencia de *A. parasiticus* (Figura 4).

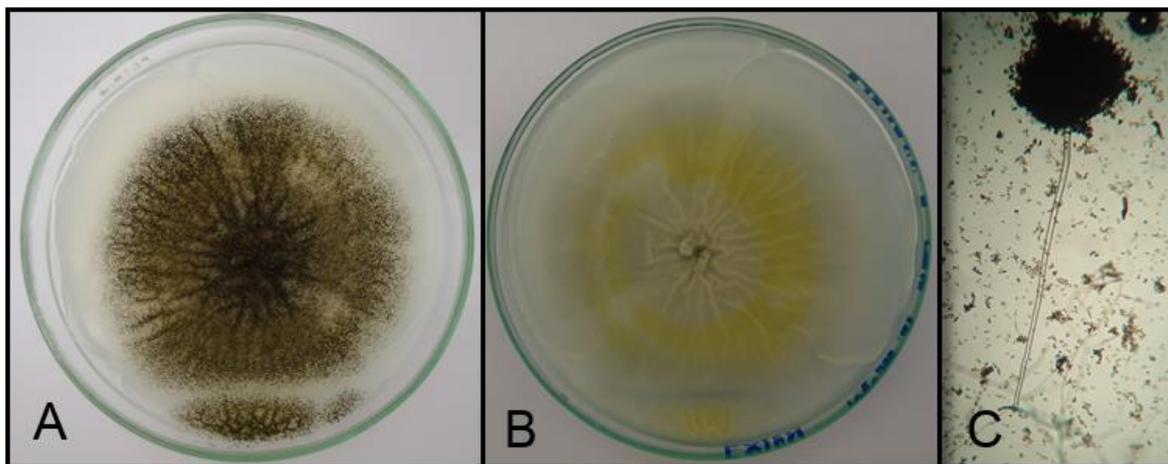
Figura 4 – Cabeça conidial de *A. flavus* evidenciando conídios suavemente enrugados.



- *Aspergillus niger*

*A. niger* semeado em meio Czapek, apresentou colônia, radialmente sulcada, com micélio branco inconspícuo, com conídios marrons escuros a pretos distribuídos de forma densa (A). O reverso incolor a amarelo (B); conídios globosos e bastante enrugados (C) (Figura 5).

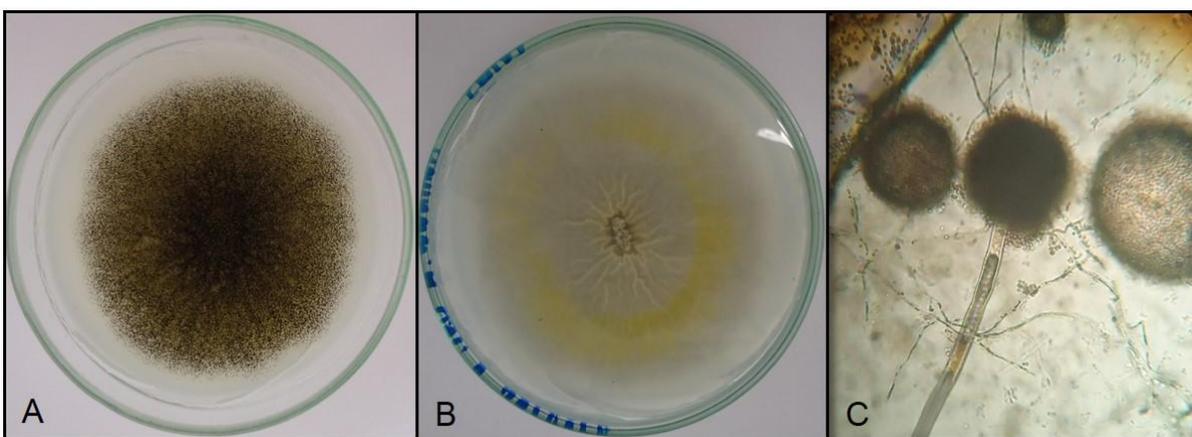
Figura 5 – Aspectos morfológicos de *Aspergillus niger*. Macroscopia verso (A), reverso (B) apresentando uma colônia sulcada em meio Czapek; e microscopia (C).



- *Aspergillus awamori*

*A. awamori* semeado em meio Czapek, apresentou colônia, radialmente sulcada, com micélio branco inconspícuo, com conídios marrons escuros a pretos distribuídos de forma densa (A), assim como o *A. niger*. O reverso também apresenta-se incolor a amarelo (B). Na microscopia, são observadas cabeças conidiais bisseriadas, conídios globosos com paredes suavemente enrugadas (Figura 6).

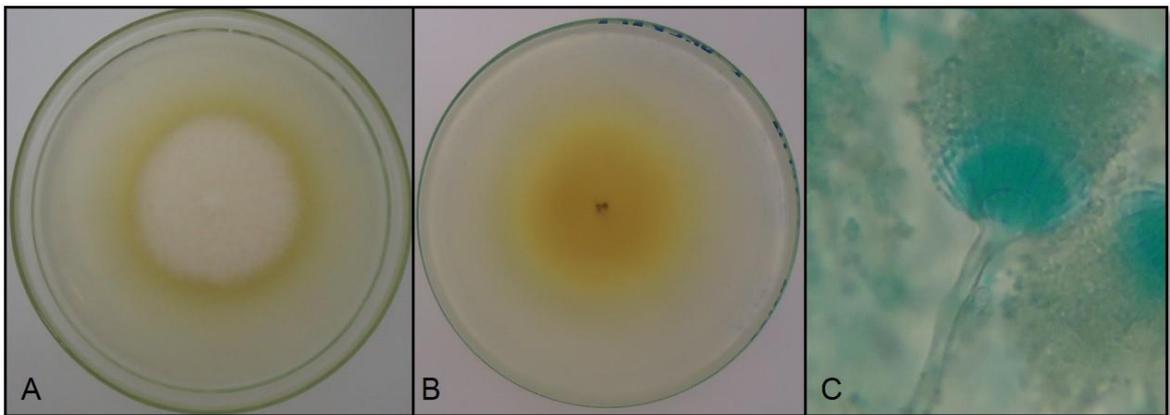
Figura 6 - Aspectos morfológicos de *Aspergillus awamori*. Macroscopia verso (A), reverso (B) apresentando colônia sulcada em meio Czapek; e microscopia (C).



- *Aspergillus niveus*

Em cultura apresentou micélio branco aveludado (A), reverso amarelo e produção de pigmento amarelo (B). Em microscopia foram observados conidióforos que são predominantemente bisseriados, presença de conídios globosos a subglobosos (C) (Figura 7).

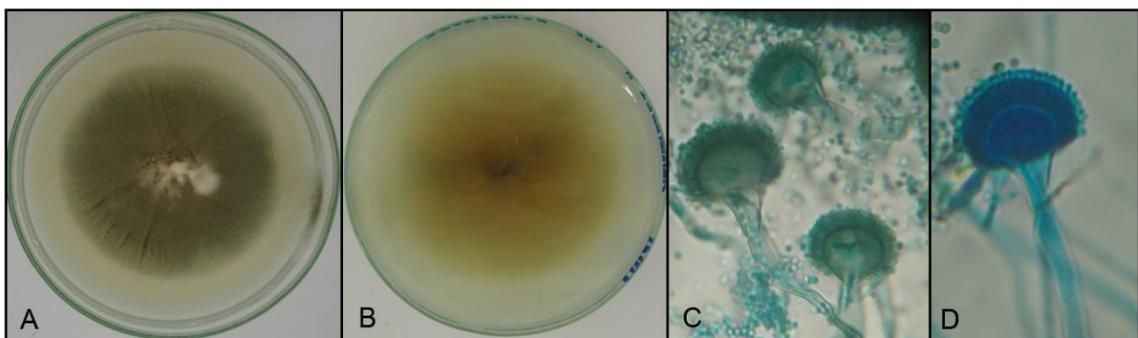
Figura 7 – Aspectos macroscópicos (A) e microscópicos (B) de *A. niveus*, semeado em meio ágar Czapek.



- *Aspergillus fumigatus*

A colônia de *A. fumigatus* em meio de cultura ágar Czapek apresentou-se na coloração cinza a azul turquesa, micélio branco, textura aveludada (A) e radialmente sulcada; reverso incolor (B); Cabeças conidiais predominantemente colunares com coloração acinzentada próximo ao ápice, com vesículas piriformes (C); São unisseriados e possuem conídios elipsoides e suavemente enrugados (D) (Figura 8).

Figura 8 – Aspectos morfológicos de *A. fumigatus*, evidenciando a macroscopia, verso (A) e reverso (B); e a microscopia (C e D).



- *Candida parapsilosis*

Os isolados URM7048 e URM7049, ambos *Candida parapsilosis*, foram revisados com base em análises bioquímicas realizadas por meio do sistema automatizado VITEK 2® Systems, quanto à assimilação de compostos de carbono (Figura 9 e 10).

Figura 9 – Avaliação e confirmação da espécie do isolado URM7048, pelo método automatizado VITEK 2® Systems.

Informações da Identificação		Hora da Análise:	18,25 Horas	Estado:	Final												
Microorganismo Seleccionado		86% Probabilidade	<i>Candida parapsilosis</i>														
Quantificação do Microorganismo		Bionúmero:	650214426113310														
Mensagens de Análise da ID																	
Detalhes Bioquímicos																	
3	LysA	-	4	IMLTa	+	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	+
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	(-)	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	+	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	+	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	-
47	dTURa	+	48	dTREa	-	49	NO3a	-	51	IARa	+	52	dGATa	-	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	-	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	-
61	IPROa	+	62	2KGa	-	63	NAGa	(-)	64	dGNTa	-						

Figura 10 – Avaliação e confirmação da espécie do isolado URM7049, pelo método automatizado, VITEK 2® Systems.

Informações da Identificação		Carta:	YST	Nº de Lote:	243224610	Data de Validade:	6/Fev/2013 12:00 GMT-06:00										
		Concluído:	22/Jul/2012 05:56 GMT-06:00	Estado:	Final	Hora da Análise:	18,25 Horas										
Microorganismo Seleccionado		93% Probabilidade		<i>Candida parapsilosis</i>													
		Bionúmero: 4502544245113310		Confiança: Muito boa identificação													
Microorganismo FRS																	
Microorganismos de Análise e Testes a Separar:																	
Mensagens da Análise:																	
Contradizem o(s) Perf(1)(s) Biológico(s) Típico(s)																	
Candida parapsilosis 2KGa(81),dGNTa(95),NAGa(78),dGATa(88),																	
Detalhes Bioquímicos																	
3	LysA	-	4	IMLTa	-	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	+
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	+	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	-	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	-	49	NO3a	-	51	IARa	+	52	dGATa	-	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	-	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	(-)
61	IPROa	+	62	2KGa	-	63	NAGa	-	64	dGNTa	-						

### 3.2 PERFIL DE CARBOIDRATOS DA PAREDE CELULAR DE FUNGOS OBTIDOS DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES COM OTITE FÚNGICA POR MEIO DE MARCAÇÃO DE LECTINAS

Os ensaios foram realizados com 25 culturas de *Aspergillus* ssp. incluindo *A. avenaceus*, *A. awamori*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. niveus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* e *A. tamarii*, e, duas de *Candida parapsilosis*, os testes seguiram para formação e quantificação de biofilme e detecção de carboidratos da parede celular dos fungos marcados com lectinas.

A histoquímica com lectinas mostrou a presença de  $\alpha$ -D-glicose/ $\alpha$ -D-manose, N-acetil-D-glicosamina/ácido N-acetilneuramínico,  $\alpha$ -L-fucose e D-galactose/N-acetil-D-galactosamina em todas as espécies estudadas de *Aspergillus*, embora padrão de marcação mostrou-se variado entre as linhagens de uma mesma espécie (Tabela 2; Figura 11). As leveduras mantiveram um padrão na presença e na coloração de metil- $\alpha$ -D-manoside e N-acetil-D-glucosamina.

Evidenciou-se uma correlação positiva entre a formação de biofilme com a expressão de  $\alpha$ -D-glicose/ $\alpha$ -D-manose e  $\alpha$ -L-fucose em *A. niveus*, além da expressão de  $\alpha$ -D-glicose/ $\alpha$ -D-manose em *A. avenaceus* (Teste de Correlação de Spearman  $r = 0.8660$ ). Adicionalmente, uma correlação negativa entre expressão de D-galactose/N-acetil-D-galactosamina e formação de biofilme foi demonstrada em *A. ochraceus* ( $r = -0.8660$ ).

Tabela 2 – Padrões de coloração com lectinas da parede celular de espécies de *Aspergillus* isolados de amostras clínicas de pacientes com otite fúngica.

CÓDIGO	ISOLADOS	Lectinas			
		Con A	UEA I	PNA	WGA
MM87A/09	<i>A. avenaceus</i>	++	+	++	+
MM87C/09	<i>A. avenaceus</i>	+	+	++	+
URM6328	<i>A. awamori</i>	+	+	+	++
URM6325	<i>A. flavus</i>	++	+++	-	+++
URM6332	<i>A. flavus</i>	++	+	+	++
URM6333	<i>A. flavus</i>	+	-	++	++
MM88A/09	<i>A. flavus</i>	+	+	+	++
URM6326	<i>A. fumigatus</i>	+	+	+	++
URM6327	<i>A. fumigatus</i>	+	-	+	++
URM6329	<i>A. niger</i>	+	-	+	-

URM6794	<i>A. niger</i>	+	-	+	-
URM6795	<i>A. niger</i>	+	-	+	-
MM88C/09	<i>A. niger</i>	++	+	+	+
URM6330	<i>A. niveus</i>	++	++	+++	++
URM6334	<i>A. niveus</i>	+	-	+	++
URM6335	<i>A. niveus</i>	++	+	-	+++
URM6321	<i>A. ochraceus</i>	++	-	+	++
URM6796	<i>A. ochraceus</i>	++	++	++	+++
URM6797	<i>A. ochraceus</i>	+	+	++	+++
URM6323	<i>A. parasiticus</i>	++	-	++	+
URM6324	<i>A. parasiticus</i>	+	+	+	+
URM6331	<i>A. parasiticus</i>	+	+	-	++
URM6322	<i>A. tamaritii</i>	-	++	+	+
URM6745	<i>A. tamaritii</i>	+	-	+	+
URM6746	<i>A. tamaritii</i>	-	++	-	+
URM7048	<i>Candida parapsilosis</i>	++	-	-	+
URM7049	<i>C. parapsilosis</i>	++	-	-	+

ConA: metil- $\alpha$ -D-manoside; UEA-I:  $\alpha$ -L-fucose; PNA: D-galactose; WGA: *N*-acetil-D-glucosamina,

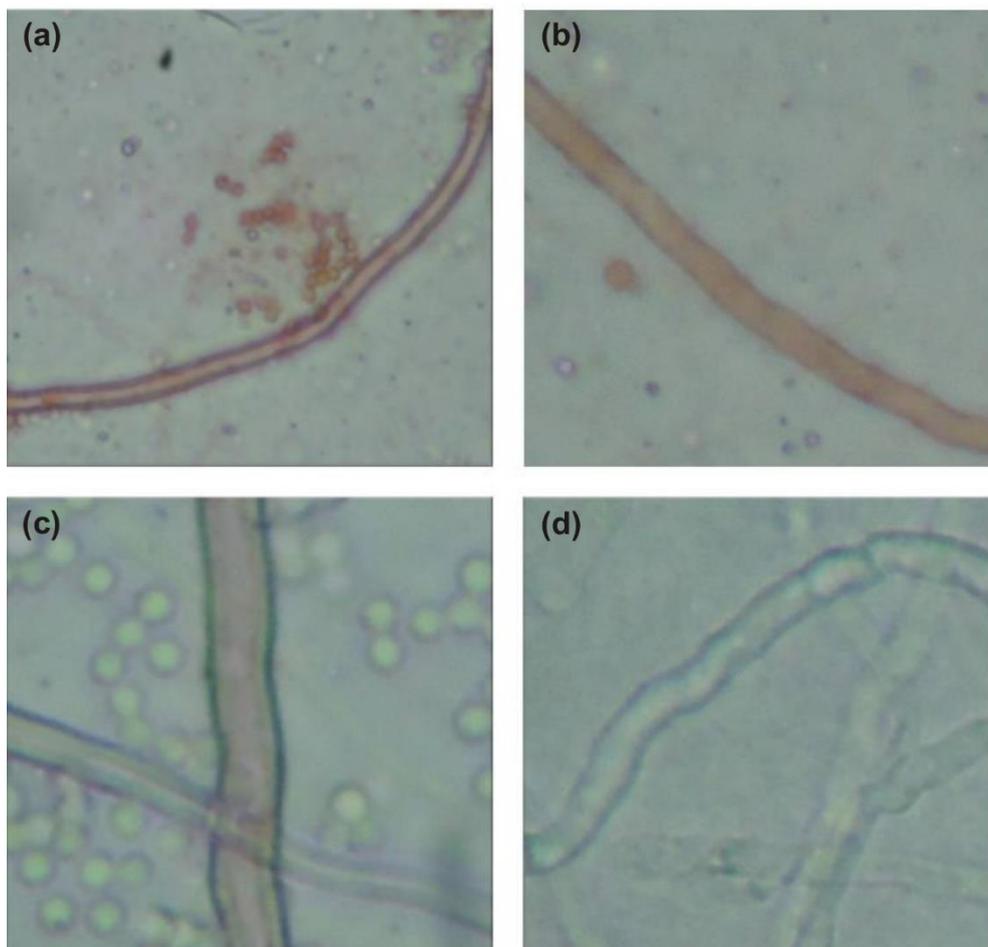
Em relação à composição química, estrutura e dimensão da parede celular, variam consideravelmente, dependendo das condições ambientais e/ou de cultivo laboratorial e essa formação é coordenada com o ciclo celular (KLIS; BOORSMA; DE GROOT, 2006).

No trabalho de Leal *et al.* (2011), os ensaios de ligação lectinas utilizando WGA, UEA, PNA e Con A, resultou em seis padrões de coloração, diferenciando as espécies *Aspergillus tamaritii*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* e *Myceliophthora vellerea*. As duas espécies de dermatófitos, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton tonsurans*, tinham os mesmos padrões de coloração, como *A. terreus* e *Paecilomyces lilacinus*. Eles observaram também que todos os isolados da mesma espécie exibiu o mesmo padrão de coloração. O que não foi observado em nosso estudo, pois houve diferença intraespecífica no perfil de marcação. Vários estudos sugerem que a expressão de carboidratos pode variar de acordo com o meio de cultura utilizado o crescimento do fungo (ALVINO; RODRIGUES; ALMEIDA, 2004). Lima Neto *et al.* (2011) afirmam que o tempo de crescimento pode influenciar na composição da superfície celular. O que foi observado em nosso estudo, uma vez que o tempo de crescimento fúngico

variou entre as espécies, possivelmente devido à exposição de antibióticos utilizados nos tratamentos que os pacientes foram submetidos.

Lima Neto *et al.* (2011), avaliaram a expressão de hidrato de carbono da superfície celular de isolados clínicos de *Candida albicans* e *C. parapsilosis* e indicaram a presença dos mesmos carboidratos que avaliamos em nosso estudo. Para estes autores, a adesão de leveduras à células epiteliais bucais humanas é mais intensa em isolados fúngicos com alta expressão de  $\alpha$ -L-fucose, marcado com UEA-I, diferente do que encontramos em nossa pesquisa, em que a lectina que marcou com mais intensidade foi a WGA. Diferente do que encontramos em nossa pesquisa, em que os resíduos de  $\alpha$ -D-manose e  $\alpha$ -L-fucose indicaram uma correlação direta com a quantificação do biofilme, e D-galactose, relação inversa.

Figura 11 - Padrões de coloração de lectinas: (a) intenso com wheat germ agglutinin (WGA) em *A. ochraceus*, (b) moderado em peanut agglutinin (PNA) em *A. niveus*, (c) fraco *Ulex europeus* agglutinin I (UEAI) em *A. ochraceus* e (d) ausente.



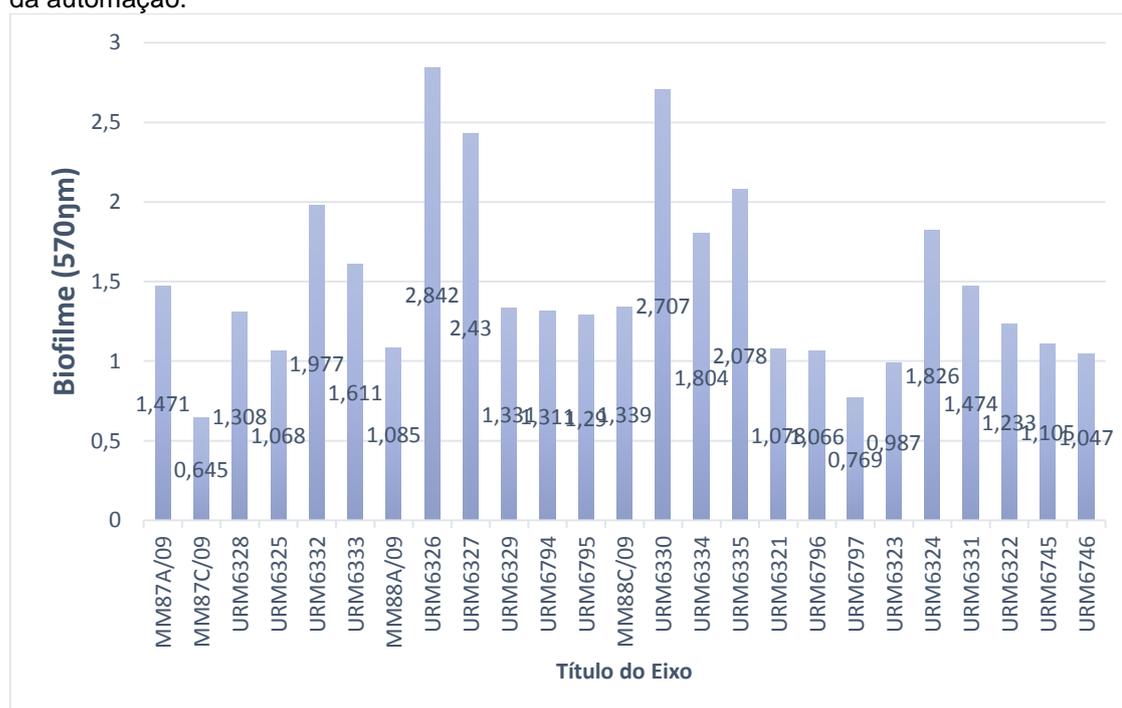
A marcação com lectinas mostrou a presença de  $\alpha$ -D-glicose/ $\alpha$ -D-manose, N-acetil-D-glicosamina/ácido N-acetilneuramínico,  $\alpha$ -L-fucose e D-galactose/N-acetil-D-galactosamina em todas as espécies estudadas. No entanto, o perfil variou intraespecificamente.

### 3.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR AGENTES DA OTOMICOSE

Todos os isolados foram capazes de formar agregados multicelulares, como mostra a Figura 12. A média quantitativa variou entre 0,64533 e 2,842. Houve diferença significativa na quantidade de biofilme formado, e de acordo com o teste estatístico Scott-Knott ( $p < 0.001$ ), dois isolados de *Aspergillus fumigatus* e um de *A. niveus* foram os que produziram maior quantidade de biofilme. No entanto, não diferiram significativamente entre si. O teste estatístico Scott-Knott segregou, pela quantificação de biofilme, os isolados em quatro grupos distintos, mas que dentro dos grupos não havia diferença significativa.

A quantificação do biofilme variou intraespecificamente em *A. avenaceus*, *A. flavus*, *A. niveus*, *A. parasiticus* e *A. tamaraii*, mas não variou em *A. niger* e *A. ochraceus*.

Figura 12 – Leitura da quantificação de biofilme por espécies de *Aspergillus*, obtida por meio da automação.



Espécies do gênero *Aspergillus* têm sido bastante relatadas como potenciais formadores de agregados celulares (MOWAT *et al.*, 2009). Infecções relacionadas com biofilme de fungos filamentosos também têm sido cada vez mais descritas (RAMAGE *et al.*, 2009), inclusive por espécies do gênero *Aspergillus* (MOWAT *et al.*, 2009). É cada vez mais claro que uma grande diversidade destes micro-organismos tem a capacidade de formar estes agregados que, clinicamente são importantes, pois, são refratários ao tratamento antifúngico, o que representa um grande problema para os clínicos como a dose necessária para erradicar o biofilme pode exceder o máximo atingível terapêuticamente as concentrações de antibióticos (Rasmussen; Givskov, 2006).

Semelhante a formação de biofilmes de bactérias ou leveduras (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000), *A. fumigatus* (DAGENAIS; KELLER, 2009), é amplamente reconhecido como um organismo capaz de crescer e desenvolver-se como uma comunidade multicelular (RAMAGE *et al.*, 2011), em que as hifas são coesa ligadas entre si por uma matriz extracelular hidrofóbica (BEAUVAIS *et al.*, 2007). Sturgulewski *et al.* (2006) afirmam que os dispositivos de amplificação sonora foram identificados como uma potencial fonte de transmissão de micro-organismos. Em longo prazo, o uso de prótese auditiva é um fator para a colonização de fungos, sendo que esta colonização pode resultar em níveis suficientemente altos para dar lugar a otomicose. Segundo Mowat *et al.* (2007), isolados de *A. fumigatus* testados por eles, obtiveram maior quantidade de biofilme em 48 horas. Após esse tempo, a quantidade estabilizou.

Em relação à quantificação do biofilme, Ruiz *et al.*, 2013, utilizando o método de coloração com cristal violeta, em 24h perceberam que o valor médio de absorção (A595) das 49 linhagens de *Candida* analisadas, variou de 0,061 a 0,308. Diferente do que obtivemos em nossos estudos com espécies de *Aspergillus*, em que a menor quantificação foi de 0,77.

Espécies de *Aspergillus* possuem potencial capacidade de formar agregados celulares, o que os tornam relevantes clinicamente.

#### 3.4 PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE OTOMICOSE

Dos 28 isolados utilizados no teste, três correspondia a espécie *A. avenaceus*, um *A. awamori*, quatro *A. flavus*, dois *A. fumigatus*, quatro *A. niger*, três *A. niveus*, três

*A. ochraceus*, três *A. parasiticus*, três *A. tamarii*, além de dois isolados de *C. parapsilosis*.

Os testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* de *Aspergillus* spp. e *Candida* spp., isolados de amostras clínicas de pacientes com otomicose frente a cetoconazol (CTZ) e ciclopirox olamina (CPO), encontram-se descritos na tabela 3.

Todos os isolados obtiveram comportamento fungicida para CTZ e CPO, sendo observado um total de 100% de inibição no crescimento tanto nos fungos filamentosos, quanto nas leveduras, exceto em um isolado de *A. fumigatus*.

No teste *in vitro*, as espécies de *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. niveus* e *A. ochraceus* tiveram o CIM melhor quando submetidos ao CPO do que ao CTZ. O contrário foi observado nas espécies de *A. avenaceus*, *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. tamarii*. Já para os isolados de *C. parapsilosis*, ambas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) foram bastante baixas.

No geral, para o CPO, todos os isolados apresentaram CIMs variando entre 0,25 e 8 µg/mL; para o CTZ, variou de 0,125 a 8 µg/mL, exceto uma espécie de *A. fumigatus* que teve o valor do CIM de 16 µg/mL, mostrando-se resistente. Já para este mesmo isolado, o CIM para CPO foi de 0,25 µg/mL.

A leitura visual das CIMs teve uma maior e mais frequente variação para CTZ do que para CPO, quando lidas por absorbância, como mostram as figuras 13 e 14.

Tabela 3 – Perfil de sensibilidade antifúngica de espécies de *Aspergillus* e *Candida*, obtidos de amostras clínicas de pacientes com otite fúngica, frente a ciclopirox olamina e cetoconazol.

Isolados/ Antifúngicos	Ciclopirox olamina	Cetoconazol
MM87A/09	4 µg/mL	2 µg/mL
MM87C/09	4 µg/mL	2 µg/mL
URM6328	1 µg/mL	8 µg/mL
URM6325	4 µg/mL	1 µg/mL
URM6332	8 µg/mL	2 µg/mL

URM6333	4 µg/mL	2 µg/mL
MM88A/09	8 µg/mL	2 µg/mL
URM6326	0,25 µg/mL	16 µg/mL
URM6327	0,5 µg/mL	8 µg/mL
URM6329	1 µg/mL	4 µg/mL
URM6794	0,25 µg/mL	8 µg/mL
URM6795	0,25 µg/mL	8 µg/mL
MM88C/09	0,25 µg/mL	2 µg/mL
URM6330	1 µg/mL	2 µg/mL
URM6334	1 µg/mL	2 µg/mL
URM6335	1 µg/mL	2 µg/mL
URM6321	0,25 µg/mL	2 µg/mL
URM6796	0,5 µg/mL	4 µg/mL
URM6797	1 µg/mL	4 µg/mL
URM6323	4 µg/mL	1 µg/mL
URM6324	4 µg/mL	2 µg/mL
URM6331	4 µg/mL	2 µg/mL
URM6322	1 µg/mL	1 µg/mL
URM6745	8 µg/mL	1 µg/mL
URM6746	0,5 µg/mL	0,125 µg/mL
URM7048	0,25 µg/mL	0,125 µg/mL
URM7049	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL
ATCC 22019	0,25 µg/mL	0,06 µg/mL

Figura 13 – Determinação das concentração inibitória mínima (CIM), obtida por leitura visual e absorvância, de espécies de *Aspergillus* e *Candida*, frente a cetoconazol.

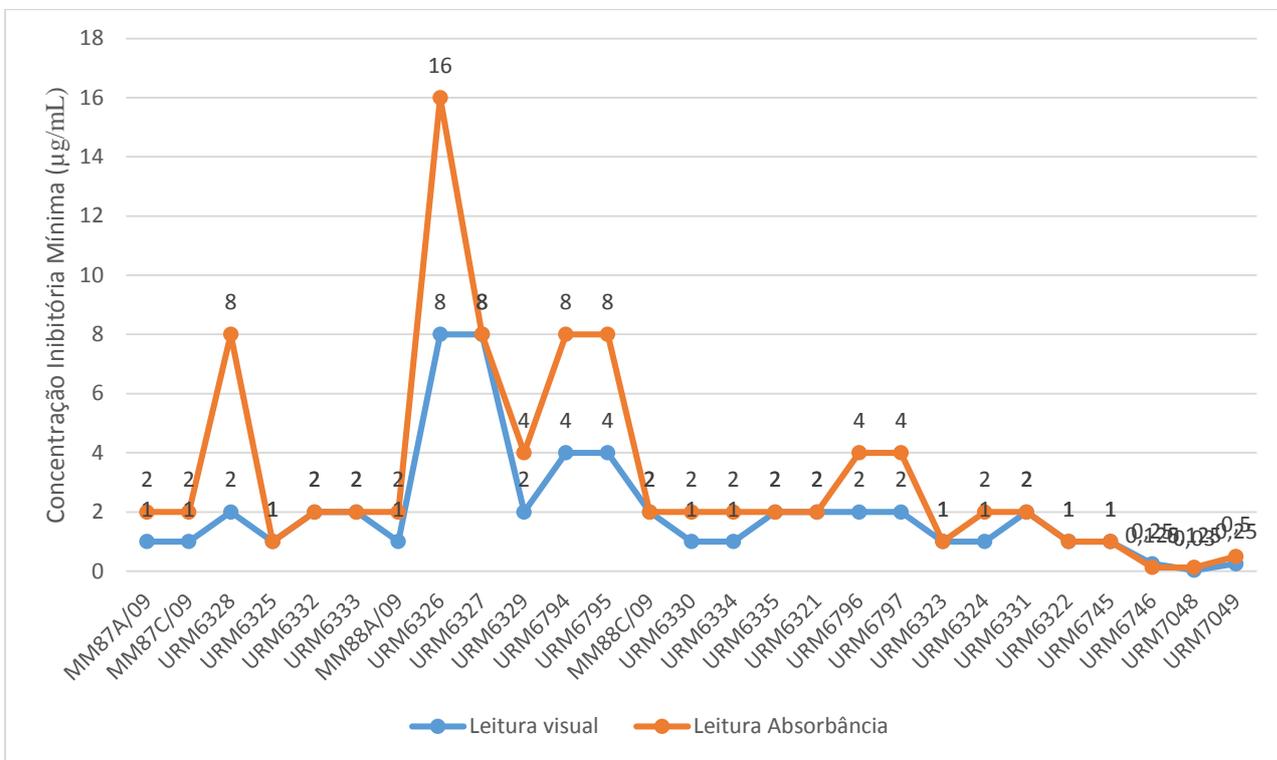
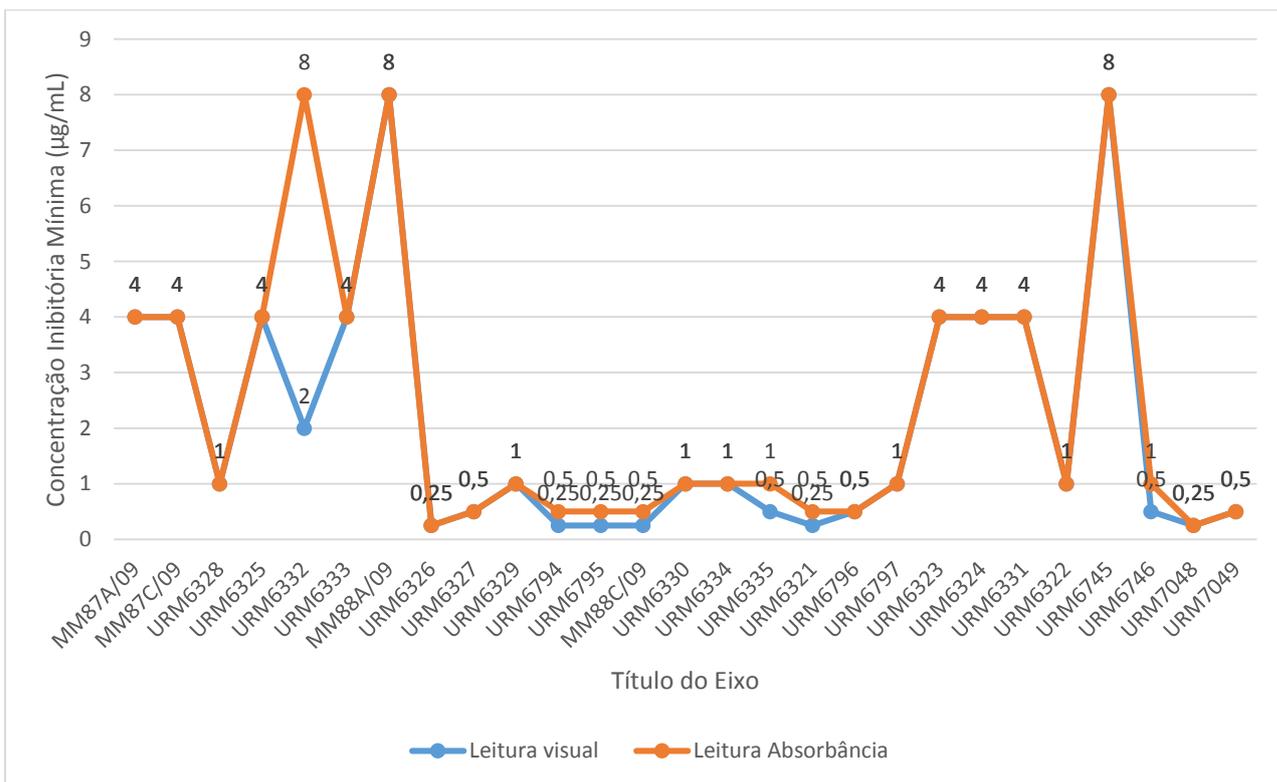


Figura 14 – Determinação das concentração inibitória mínima (CIM), obtida por leitura visual e absorvância, de espécies de *Aspergillus* e *Candida*, frente a ciclopirox olamina.



Espécies de *Aspergillus* e *Candida* são os principais agentes etiológicos da otomicose. Contudo, trabalhos recentes apontam que *A. niger* continua sendo o mais frequente agente (YENISEHIRLI *et al.*, 2009; ANEJA; SHARMA; JOSHI, 2010; JIA *et al.*, 2011; SARVAN *et al.*, 2012), seguido de *A. flavus* e *A. fumigatus*. No entanto, em nossa pesquisa não observamos uma prevalência em relação as espécies isoladas de otomicose.

Muitos antifúngicos têm sido utilizados por otorrinolaringologistas, na busca de um tratamento eficaz. Assim, Arthur, Drew e Perfect (2004) apontam a importância de se identificar o agente etiológico em nível de espécie e suas características intrínsecas para escolha de um tratamento adequado, já que nem todas as espécies têm os mesmos padrões de susceptibilidade contra os antifúngicos (Nemati *et al.*, 2013; Aktas; Yigit, 2009; Balajee *et al.*, 2007).

Munguia e Daniel (2008), afirmam que os azólicos são eficazes para o tratamento de otomicoses. Segundo Ho *et al.* (2006), o CTZ, que um antifúngico azólico com largo espectro de atividade, é eficaz no tratamento dos agentes etiológicos mais comuns da otite fúngica. E atualmente é utilizado como antifúngico padrão para casos de otomicose. Os autores ainda verificaram que o CTZ mostrou eficácia de 95-100% *in vitro* contra as espécies de *Aspergillus* e de *C. albicans*, obtidos de casos de otomicose, o que corrobora com nossa pesquisa, uma vez que apenas um isolado mostrou-se resistente ao fármaco, o que foi observado após a leitura por absorvância. Estudos têm demonstrado o valor da automatização nas leituras espectrofotométricas nos testes de susceptibilidade aos antifúngicos, pois oferece a vantagem de se obter uma leitura mais objetiva para a determinação da CIM (ODDS; MESSER; WOESTENBORGH, 1995; RODRÍGUES-TUDELA; MARTINEZ-SUÁREZ, 1995).

Para fungos do grupo nigri como *A. awamori* e *A. niger*, a CIM variou de 2 a 8  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  em nosso estudo. Szigeti *et al.* (2012) também avaliaram espécies do grupo nigri de *A. awamori* e *A. tubingensis*, isolados de otomicose, e verificaram que foram pouco susceptíveis a resistentes ao CTZ, pela qual a CIM variou entre 8-16  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Novas alternativas têm sido propostas para o tratamento da otomicose. Nesta pesquisa, avaliamos a capacidade do CPO em inibir o crescimento de fungos causadores de otite fúngica.

No entanto, o CLSI (2008) faz referência apenas a dermatófitos quanto ao uso do CPO, e demonstram que os que apresentarem  $\text{CIM} \leq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$  frente este fármaco

são considerados sensíveis. Entretanto, Markus (1999) e Jue, Dawson e Brogde (1985) citaram que o CPO pode ser considerado tanto fungistático quanto fungicida, e encontraram CIM no intervalo de  $0,9 \pm 3,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para dermatófitos e espécies de *Candida*, e para espécies de *Aspergillus*, 7,8 e  $15,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , o que confere com nossos estudos no qual a maior CIM encontrada foi  $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para espécies de *Aspergillus*, e  $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para *C. parapsilosis*, o que aponta, para estes grupos fúngicos, uma maior suscetibilidade a este antifúngico, quando comparado ao CTZ.

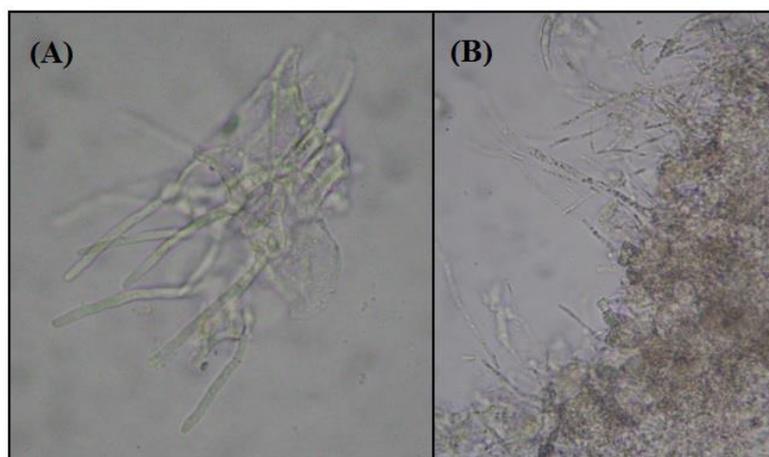
### 3.5 RESPOSTA TERAPÊUTICA À OTOMICOSE EXPERIMENTAL

A escolha do agente etiológico para otomicose experimental foi baseada nas condições de maior produção de biofilme, além do tratamento mais eficaz *in vitro*, frente as drogas testadas. Desta forma, foi determinado o uso do isolado URM6330, *Aspergillus niveus*.

Após a aprovação do Comitê de Ética Animal, foi realizada a administração da ciclofosfamida, e a imunossupressão foi confirmada por meio da avaliação do hemograma nos animais.

Decorridos sete dias de infecção, em exame direto, sem clarificante e corante, foram observados em 75% de amostras dos animais, em microscopia óptica, filamentos micelianos, hialinos, septados em dicotomia (Figura 15). O tratamento foi realizado com ciclopirox olamina e cetoconazol, nos respectivos grupos durante sete dias.

Figura 15 - Exame direto de secreção do conduto auditivo externo animal: (A) hifas hialinas, septadas em dicotomia; (B) hifas hialinas septadas associadas ao tecido animal.



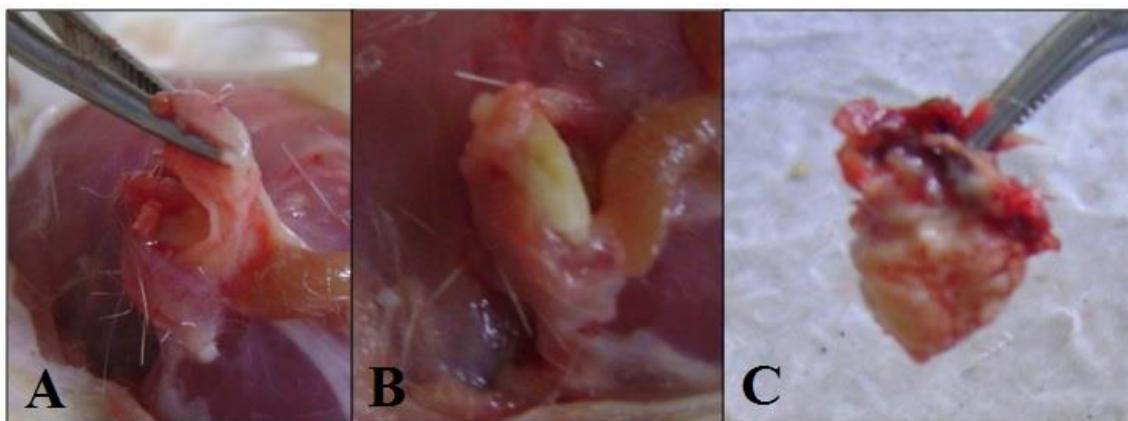
Após 15 dias, foi realizado o sacrifício dos animais, e, fragmentos do tecido foram preparados exames micológico e histopatológico.

Durante a retirada da bula timpânica, foram observadas massas brancas, indicando a presença fúngica (Figura 16). Os animais apresentavam inflamação com otorreia, obstrução do CAE devido a fragmentos fúngicos.

Não houve eficácia nos tratamentos, provavelmente porque o tratamento foi realizado em apenas sete dias.

No exame micológico, com tecido do conduto auditivo externo e retrocultivo do material biológico, após três dias foi observado o crescimento fúngico e identificado de *Aspergillus niveus*.

Figura 16 - Aspectos da infecção do conduto auditivo externo. (A) conduto auditivo externo (CAE); (B) Massa fúngica no CAE; (C) conduto auditivo externo recoberto por massa fúngica.



Nossa pesquisa foi baseada nos trabalho de Emgard e Hellström (1997), na sua publicação, determinaram um procedimento padronizado para estimulação mecânica do conduto auditivo externo e que provocou uma reação semelhante na qual ocorre em otite externa humana. Eles afirmam que tal modelo animal de otite externa pode ser utilizada para estudos sobre patogênese da otite, como otites fúngicas, bem como para testar estratégias de tratamentos, no entanto, utilizaram apenas bactérias e leveduras.

## 4 CONCLUSÃO

Com base nesse estudo podemos concluir que:

- Espécies de *Aspergillus* são potencialmente formadores de biofilme.
- $\alpha$ -D-glicose/ $\alpha$ -D-manose, N-acetil-D-glicosamina/ácido N-acetilneuramínico,  $\alpha$ -L-fucose e D-galactose/ N-acetil-D-galactosamina estão presentes na parede celular de espécies de *Aspergillus*.
- A presença de resíduos de  $\alpha$ -D-glicose/  $\alpha$ -D-manose e  $\alpha$ -L-fucose nos glicoconjugados de superfície celular em algumas espécies de *Aspergillus* estão associadas ao reconhecimento molecular e formação de biofilme, enquanto que a presença de D-galactose/ N-acetil-D-galactosamina, está correlacionado à ausência dessa característica de patogenicidade em outras.
- Ciclopirox olamina e cetoconazol tem comportamento fungicida, *in vitro*, frente a espécies de *Aspergillus* e *Candida*.
- Cepas de *A. fumigatus* podem apresentar resistência *in vitro* ao cetoconazol.
- Ratos da linhagem Wistar são indicados para experimentação animal de doenças da orelha externa devido à semelhança com a orelha humana.
- Ratos Wistar são susceptíveis a infecção do conduto auditivo externo por *Aspergillus niveus*, quando imunossuprimidos.
- Ciclopirox olamina e cetoconazol, não foram consideradas opções terapêuticas eficazes nos casos de otomicose experimental por *A. niveus*, em um período de sete dias.

## REFERÊNCIAS

- ABOULMAKARIM, S., TLIGUI, H., EL MRINI, M., ZAKARIA, I., HANDOUR, N., AGOUMI, A. Otomycoses: étude clinique et mycologique de 70 cas. **Journal de Mycologie Médicale**, v.20, p.48-52, jan. 2010.
- ADAMS, David J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, Reading, v.150, n.7, p.2029-2035, 2004.
- AFSHARI, M.A., KACHOOEI, R., AJALLOEIAN, M. Assessment of prevalence of otomycosis in ENT clinic in Baqiyatallah (AS) hospital. **Journal of Military Medicine**, v.2, p.121-4, 2005.
- AHMAD, N., ETHERIDGE, C., FARRINGTON, M., BAGULEY, D.M. Prospective study of the microbiological flora of hearing aid moulds and the efficacy of current cleaning techniques. **The Journal of Laryngology and Otology**, v.121, p.110-113, 2007.
- AKTAS, E., YIGIT, N. Determination of antifungal susceptibility of *Aspergillus* spp. responsible for otomycosis by E-test method. **Journal de Mycologie Médicale**, v.19, p.122-5, 2009.
- ALBIIN, N., HELLSTRÖM, S., SALÉN, B., STENFORS, L-E., SÖDERBERG, O. The anatomy of the Eustachian tube in the rat: a macroand microscopical study. **Anat Rec.**, v.207, p.513, 1983.
- ALBUQUERQUE, A.A.S.; ROSSATO, R.; OLIVEIRA, J.A.O.; HYPOLITO, M.A. Conhecimento da anatomia da orelha de cobaias e ratos e sua aplicação na pesquisa otológica básica. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v.75, n.1, p.43-9, 2009.
- ALVINO, D.S., RODRIGUES, M.L., ALMEIDA, C.A. Differential expression of sialylglycoconjugates and sialidase activity in distinct morphological stages of *Fonsecaea pedrosoi*. **Arch Microbiol**, v.181, p.278-86, 2004
- ANEJA, K.R., SHARMA, C., JOSHI, R. Fungal infection of the ear: A common problem in the northeastern part of Haryana. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v.74, p.604-607, 2010.
- ANNAIX, V., BOUCHARA, J.P., LARCHER, G., CHABASSE, D., TRONCHIN, G. Specific binding of human fibrinogen fragment D to *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infect. Immun.**, 60, 1747-1755, 1992.
- ARAIZA, J., CANSECO, P., BONIFAZ, A. Otomycosis: clinical and mycological study of 97 cases. **Rev Laryngology Otology Rhinology (Bord)**, v.127; n.4; p.251-4, 2006.
- ARTHUR, R.R., DREW, R.H., PERFECT, J.R. Novel modes of antifungal drug administration. **Expert Opin Investig. Drugs**, v.13, p.903-32, 2004.

BALAJEE, S.A., HOUBRAKEN. J., VERWEIJ, P.E., HONG, S.B., YAGHUCHI, T., VARGA, J., SAMSON, R.A. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. **Stud Mycol**, v.59, p.39-46, 2007.

BANKAITIS, A.U. Hearing aids: lick 'EM and stick 'EM? **Audiology Today**, v.17, p. 2-3, 2005.

BARATI, B., OKHOVVAT, S.D.R., GOLJANIAN, A., OMRANI, M.R. Otomycosis in central Iran: a clinical and mycological study. **Iranian Red Crescent medical journal**, v.13, n.12, p.873-6, 2011.

BARNETT, J.A., PAINE, R.W., YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge. 2000.

BARRETT-BEE, K., HAYES, Y., WILSON, R.G., RYLEY, J.F. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. **J Gen Microbiol**, 131(5): 1217-21, may 1985.

BASMA, R., BARADA, G., OJAIMI, N., KHALAF R.A. Susceptibility of *Candida albicans* to common and novel antifungal drugs, and relationship between the mating type locus and resistance, in Lebanese hospital isolates. **Mycoses**, v.52, p.141–148, 2009.

BEAUVAIS, A., SCHMIDT, C., GUADAGNINI, S., ROUX, P., PERRET, E., HENRY, C., PARIS, S., MALLET, A., PRÉVOST, M.C., LATGÉ, J.P. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. **Cell. Microbiol.** v.9, p.1588 –1600, 2007.

BELLINI, C., ANTONINI, P., ERMANNI, S., *et al.* Malignant otitis externa due to *Aspergillus niger*. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.35, p.284-8, 2003.

BETH, D.S., ROBERT, G.T. **Basic and Clinical Biostatistics**, 2<sup>nd</sup> edition. New York: Appleton & Lange. 1990.

BHALLY, H.S., SHIELDS, C., LIN, S.Y., MERZ, W.G. Otitis caused by *Scedosporium apiospermum* in an immunocompetent child. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v.68, cap.7, p.975-978, 2004.

BLANKENSHIP, J.R., MITCHELL, A.P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Curr Opin Microbiol**, v.9, p.588–594, 2006.

BORKOWSKI, G., GURR, A., STARK, T., *et al.* Funktionelle und morphologische Störungen des mukoziliaren Systems bei der sekretorischen Otitis media. **Laryngorhinootologie**, v.79, p.135-8, 2000.

BROMLEY, I. M.J., DONALDSON, K. Binding of *Aspergillus fumigatus* spores to lung epithelial cells and basement membrane proteins: relevance to the asthmatic lung. **Thorax**, 51, 1203-1209, 1996.

BROOKS, G.F., BUTEL, J.S., MORSE, S.A. **Microbiologia Médica**. 21ªedition. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.142-145, p.485, 611p. 2000.

BUSSCHER, H.J., RINASTITI, M., SISWOMIHARDJO, W., VAN DER MEI, H.C. 2010. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. **J. Dent. Res.** 89:657–665.

CALDERONE, R.A. Recognition between *Candida albicans* and host cells. **Trends Microbiol**, v.1, p.55–58, 1993.

CALDERONE, R.A.; FONZI, W. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, v. 9, n.7, p. 327-31, 2001.

CARFRAE, M.J., KESSER, B.W. Malignant otitis externa. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v.41, p.537-49, 2008.

CARNEY, A.S. Otitis externa and otomycosis. In: Gleeson MJ, Jones NS, Clarke R, et al (eds). *Scott-Brown's Otolaryngology, Head and Neck Surgery*, v.3. 7 th ed. London: Hodder Arnold Publishers; 2008. p. 3351-7.

CARRANZA, J.M. **Técnicas e métodos elementares para el estudio de hongos sitopásitos**. 2ªedição, Universidad Nacional de La Plata, Bolívia. 1949.

CHAKRABARTI, A., NAVAK, N., TALWAR, P. In vitro proteinases production by *Candida* species. **Mycopathologia**, 114:163-168, 1991.

CHANDRA, J., KUHN, D.M., MUKHERJEE, P.K., HOYER, L. MCCORMICK, T., GHANNOUM, M.A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol**, v.183, p.5385–5394, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M27-A3 [ISBN 1-56238-666-2]. CLSI, Pennsylvania, USA 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. CLSI document M38-A2 [ISBN 1-56238-668-9]. CLSI, Pennsylvania, USA 2008.

COSTA, S.S., SOUSA, L.C.A. Otite média crônica não-colesteatomatosa. In: Campos CAH, Costa HOO. **Tratado de Otorrinolaringologia**. São Paulo: Roca. 2002. p.72-92.

COULOT, P., BOUCHARA, J. P., RENIER, G., ANNAIX, V., PLANCHENAULT C., TRONCHIN, G., CHABASSE, D. Specific interaction of *Aspergillus fumigatus* with fibrinogen and its role in cell adhesion. *Infect. Immun.* 62, 2169-2177, 1994.

DALMAU, L.M. **Annual Parasitology Human Compendium**, v.7, p.536, 1929.

DE HOOG, G.S., GUARRO, J., GENE, J., FIGUERAS, M.J. **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd edition. The Netherlands. Central bureau voor Schimmelcultuur. 2000.

Del Palacio, A., Cuétara, M.S., López-Suso, M.J., *et al.* Randomized prospective comparative study: short-term treatment with ciclopiroxolamine (cream and solution) versus boric acid in the treatment of otomycosis. **Mycoses** v. 45, p. 317-28, 2002.

DAGENAIS, T.R., KELLER, N.P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. **Clin. Microbiol. Ver**, v.22, p.447– 465, 2009.

DI BONAVENTURA, G., POMPILIO, A., PICCIANI, C., IEZZI, M., D'ANTONIO, D., PICCOLOMINI, R. "Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance," **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.10, pp.3269–3276, 2006.

DI DIO, L.J.A. **Tratado de Anatomia Sistêmica Aplicada**. 2<sup>a</sup> ed., São Paulo: Atheneu. v.2, cap.19, p.902-24, 948p. 2002.

DOMSCH, K.H., GAMS, W., ANDERSON, T. **Compendium of soil fungi**. San Francisco, IHW Verlag. 1993.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis**, v.8, p.881–890, mes.2002.

DURAN, A.; NOMBELA, C. Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. **Microbiology**, Reading, v.150, n.10, p.3099–3103, 2004.

ELLEPOLA, A.N.B., SAMARANAYAKE, L.P. "Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents," **Archives of Oral Biology**, v.43, n.12, p.999–1007, 1998.

EMGARD, P., HELLSTRÖM, S. An animal model for external otitis. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v.254, p.115-119, 1997.

EMGÅRD, P., HELLSTRÖM, S. A topical steroid without an antibiotic cures external otitis efficiently: a study in an animal model. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v.258, p.287–291, 2001.

EMGARD, P. External otitis and its treatment. is a group iii steroid without antibiotics sufficient therapy? – experimental and clinical studies. Hansson och Kotte i Ystad Tryckeri AB, Ystad, Sweden. 2005.

ENOZ, M., SEVINC, I., LAPEÑA, J.F. Organismos bacterianos e fúngicos em pacientes com otite externa sem fatores de risco para infecção fúngica em Erzurum, Turquia. **Brazilian Journal Otorhinolaryngology**, v.75, cap.5, p.721-725, 2009.

ERJAVE, Č.Z., VERWEIJ, P.E. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. **Drug Resistance Updates**, Amsterdam, v.5, n.1, p.3-10, 2002.

FINLAY, B.B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiol Rev**, v. 53, p. 210-30, 1989.

FREIRE, M.G. Isolamento, caracterização físico-química e estudo das atividades inseticida, microbicida e inflamatória da lectina de sementes de *Talísia Esculenta* (ST. HILL) RALDLAK. 2003. 189p. Tese (Doutorado em Bioquímica). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas,SP, 2001.

GARCÍA-AGUDO, L., AZNAR-MARÍN, P., GALÁN-SÁNCHEZ, F., GARCÍA-MARTOS, P. MARÍN-CASANOVA, P., RODRÍGUEZ-IGLESIAS, M. Otomycosis due to filamentous fungi. **Mycopathologia**, v.172, p.307–310, 2011.

GUATIMOSIM, M.H.E. “Doenças da Orelha”. In: Sociedade Brasil. ORL. **Tratado de Otorrinolaringologia**. 1 ed., São Paulo: Editora Roca. v.2, cap.1, p.3-20. 2002.

GHANNOUM, M.A., RADWAN, S.S. **Candida Adherence to epithelial cells**. New York: CRC Press, 1990.

GHANNOUM, M.A., ABU-ELTEEN, K.H. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**; 33(6): 265-82, Jun 1990.

GHIACEI, S. Survey of Otomycosis in northwestern area of Iran. **Medical Journal of Masshad University of Medical Sciences**, v.43, p.85-87, 2001.

GOLDMAN, G.H., FERREIRA, M.E.S., MARQUES E.R., SAVOLDI, M., PERLIN, D., PARK, S., MARTINEZ, P.C.G., GOLDMAN, M.H., COLOMBO, A.L. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.50, n.1, p.25-32, 2004.

GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OZAWA, T., SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v.285, p.66, 1980.

HAWKE, M., BINGHAM, B., STAMMBERGER, H., BENJAMIN, B. **Manual de diagnóstico de otorrinolaringologia**. Argentina: Aula Médica. v.2, p.40-41. 1997.

HO, T., VRABEC, J.T., YOO, D., *ET al*. Otomycosis: clinical features and treatment implications. **Otolaryngology Head Neck Surgery**, v.135, n.5, p.787-791, 2006.

JABRA-RIZK, M.A., FALKLER, W.A., MEILLER, T.F. Fungal biofilms and drug resistance. **Emerg Infect Dis**, v.10, p.14–19, 2004.

JACKMAN, A., WARD, R., APRIL, M., *et al*. Topical antibiotic induced otomycosis. **The International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v.69, n.6, p.857-60, 2005.

JADHAV, V.J., PAL, M., MISHRA, G.S. Etiological significance of *Candida albicans* in otitis externa. **Mycopathologia**, v.156, cap.4, p.313-5, 2003.

JIA, X., LIANG, Q., CHI, F., CAO, W. Otomycosis in Shanghai: aetiology, clinical features and therapy. **Mycoses**, v.55, p.404–409, 2012.

JONES, E.D. Onychomycosis: Current Treatment Options. **Journal of the American Academy of Nurse Practitioners**, v.15, p.165–169, 2003

JUE, S.G., DAUSON, G.W., BROGDEN, R.N. Ciclopirox olamine 1% cream. A preliminary review of its antimicrobial activity and therapeutic use. **Drugs**, v.29, p.330-341, 1985.

JUNQUEIRA, L.C.U., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap.23, p.466-471, 488p. 2004.

KAIEDA, S. Fungal infection in the otorinolaryngologic area. Nippon Rinsho. **Japanese Journal of clinical medicine**, v.66, n.12, p.2290-2293, 2008.

Kaur, R., Mittal, N., Kakkar, M., *et al.* Otomycosis: a clinicomycologic study. **Ear, Nose and Throat Journal**, v.79, cap.8, p.606-609, 2000.

KAZEMI, A.H., GHIAEI, S. Survey of Otomycosis in northwestern area of Iran, 1997-2004. **Journal Mazandaran University of Medical Science**, v.48, p.112-9, 2005.

KLICH, M.A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht, Centraalbureau vöör Schimmelcultures. 2002.

KLIS, F.M., BOORSMA, A., DE GROOT, P.W. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.23, n.3, p.185-202, 2006.

KLUTTS, J.S., YONEDA, A., REILLY, M.C., BOSE, I., DOERING, T.L. Glycosyltransferases and their products: cryptococcal variations on fungal themes. **FEMS Yeast Research**, v.6, n.4, p.499-512, 2006.

KUMAR, A. Fungal Spectrum in Otomycosis Patients. **JK Science**, v.7, n.3, p.152-155, 2005.

KURNATOWSKI, P., KILIPIAK, A. Otomycosis: prevalence, clinical symptoms, therapeutic procedure. **Mycoses**, v.44, n.11, p.472-479, 2001.

LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., VACCARI, E.M.H., MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. 9ªed. São Paulo: Sarvier. Cap.10, p.296-297; cap.13, p.364-384, 1104p. 2002.

LEAL, A. *et al.* *Novo método para marcação com lectinas em fungo filamentoso*. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, Programação e resumos, Recife. 2007.

LEAL, A. F. G., LOPES, N. E. P., CLARK, A. T. R., PONTES FILHO, N. T., BELTRÃO, E. I. C., NEVES, R. P. Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugates of *Aspergillus* species in brain and lung tissues using lectin histochemistry. **Medical Mycology. Early Online**, 1–4. 2011a.

LEAL, A.F.G., LIMA NETO, R.G., MACÊDO, D.P.C., BELTRÃO, E.I.C., NEVES, R.J. Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugates of *Trichophyton tonsurans* and other keratinophilic filamentous fungi using lectins. **Mycoses**, v.54, p.789–794, 2011b.

LEE, D.H., JUN, B.C., KIM, D.G., JUNG, M.K., YEO, S.W. Volume variation of mastoid pneumatization in different age groups: a study by three-dimensional reconstruction based on computed tomography images. **Surg Radiol Anat** (Seoul), v.27, p.37-42, 2005.

LESLIE, J.F., SUMMERELL, B.A. **The Fusarium laboratory manual**. Blackwell Publishing, USA. 2006.

LIMA-NETO, R.G., BELTRÃO, E.I., OLIVEIRA, P.C., NEVES, R.P. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. **Mycoses**, v.54, p.23–29, 2009.

LIS, H., SHARON, N. *Lectins in higher plants*. In: MARCUS, A. The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise. Proteins and nucleic acids. v. 6 New York: Academic Press, p.371-447, 1981.

LÓPEZ-RIBOT, J.L., CASANOVA, M., MURGUI, A., MARTÍNEZ, J.P. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.41, n.3, p.187-196, 2004.

MAHMOUDABADI, A.Z. Mycological study in 15 cases of otomycosis. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v.22, n.4, p.486-488, 2006.

MAHMOUDABADI, A.Z., MASOOMI, S.A., MOHAMMADI, H. Clinical and mycological studies of otomycosis. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v.26, n.1, p.187-190, 2010.

MARÍN, P., GARCÍA-MARTOS, P., PUERTO, J. L., MIRA, J. Otomycosis by *Aspergillus* in Cádiz (Spain). **Revista Iberoamericana de Micología**. Hospital Puerta del Mar.Cádiz. Spain. v.17, p.151, 2000.

MARTINEZ, L.R., FRIES, B.C. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. **Curr Fungal Infect Rep**, v.4, p.266–275, 2010.

MACCALLUM, D.M., COSTE A., ISCHER F., JACOBSEN M.D., ODDS F.C., SANGLARD, D. Genetic Dissection of Azole Resistance Mechanisms in *Candida albicans* and Their Validation in a Mouse Model of Disseminated Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.1476 – 1483, 2010.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO.J. F.; ROBBINS, P. W. Glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Shizoccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**, New York, v.336, n.2, p.202-212, 2005.

MARKUS A. Hydroxy-pyridones. Outstanding biological properties. In: Shuster S, ed. Hydroxy-pyridones as Antifungal Agents with Special Emphasis on Onychomycosis. Berlin: Springer-Verlag, 1±10. 1999.

MENEZES, P.L., CALDAS NETO, S., MOTTA, M.A. Anatomofisiologia da Orelha. Em:\_\_\_\_\_ **Biofísica da Audição**. São Paulo: Lovise, cap. 5, p. 87-90, 188 p. 2005.

MGBE, R.B., UMANA, A., ADEKANYE, A.G., OFFIONG, M.E. Otomycosis - A Management Challenge In Calabar, South-South Nigeria. **The Internet Journal of Third World Medicine**. v.9, n.2, 2011.

MIERTUSOVA, S., SIMALJAKOVA, M. Yeasts and fungi isolated at the mycology laboratory of the First Dermatovenerology Clinic of the Medical Faculty Hospital of Comenius University in Bratislava (1995-2000). **Epidemiology Microbiology e Immunology**, v.52, n.2, p.76-80, 2003.

MISHRA, G.S., MEHTA, N., PAL, M. Chronic bilateral otomycosis caused by *Aspergillus niger*. **Mycoses**, v.47, cap.1-2, p.82-4, 2004.

MOORE, K.L., AGUR, A.M.R. **Fundamentos de Anatomia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 8, p. 351-357, 436p. 1998.

MOGADAM, A.Y., ASADI, M.A., DEGHANI, R., HOOSHYAR, H. The prevalence of otomycosis in Kashan, Iran, during 2001-2003. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v.2, n.1, p.18-21, 2009.

MOWAT, E., WILLIAMS, C., JONES, B., MCCHLERY, S., RAMAGE, G. "The characteristics of *Aspergillus fumigatus* mycetoma development: is this a biofilm?" **Medical Mycology**, v.47, supplement 1, pp.S120–S126, 2009.

Mowat, E., BUTCHER, J., LANG, S., WILLIAMS, C., RAMAGE, G. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.1205–1212, 2007.

MUNGUIA, R., DANIEL, S.J. Otological antifungals and otomycosis: a review. **The International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v.72; cap.4, p.453-9, 2008.

NEMATI, S., HASSANZADEH, R., JAHROMI, S. K., ABADI, A. D. N. Otomycosis in the north of Iran: common pathogens and resistance to antifungal agents. **European archives of otorhinolaryngology**, v.247, n.1, 2013.

NICHOLS, A.W. Nonorthopaedic problems in the aquatic athlete. **Clinics in sports medicine**, v.18, n.2, p.395-411, 1999.

NIEWERTH, M., KORTING, H.C. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses**,; 44(9-10): 361-7, Nov 2001.

NIEWERTH, M., D. KUNZE, M. SEIBOLD, M. SCHALLER, H. C. KORTING, HUBE, B. Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes

encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.1805-1817, 2003.

NIMRICHTER, L., RODRIGUES, M. L.; RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, L. R. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. **Microbes and Infection**, Paris, v.7, n.4, p.789– 798, 2005.

NOGUEIRA, J.C.R., DINIZ, M.F.F.M, LIMA, E.O., LIMA, Z.N. Identificação e susceptibilidade antimicrobiana de micro-organismos obtidos de otite externa aguda. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.74, n.4, p.526-30, 2008.

NWABUISI, C., OLOGE, F.E. The fungal profile of otomycosis patients in Ilorin, Nigeria. **Nigerian Journal of Medicine**, v.10, n.3, p.124-126, 2001.

ODDS, F.C., MESSER, S.A., WOESTENBORGH, F. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.39, 2051, 1995.

OLINA, M., CAMETTI, M., GUGLIEMMETTI, C., GATTONI, M., LEIGHEB, G., PIA, F. External otitis. **Recenti Progressi in Medicina**, v.93, n.2, p.104-107, 2002.

O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Mol Microbiol**, cidade, v.28, p.449–461, 1998.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu Rev Microbiol.**, v.54, p.49-79, 2000.

OZCAN, K.M., OZCAN, M., KARAARSLAN, A., KARAARSLAN, F. Otomycosis in Turkey: predisposing factors, etiology and therapy. **The Journal of Laryngology and Otology**, v.117, n.1, p.39-42, 2003a.

OZCAN, M., OZCAN, K.M., KARAASLAN, A., *et al.* Concomitant otomycosis and dermatomycoses: a clinical and microbiological study. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v.260, n.1, p.24-7, 2003b.

OZER, E. Effects of prenatal exposure on neuronal migration, neurogenesis and brain myelinization in the mice brain. **Clin. Neuropathol**, v.19, n.1, p.21-25, 2000.

PARIZE, P., CHANDESRIS, M.O., LANTERNIER, F., *et al.* Antifungal therapy of *Aspergillus* invasive otitis externa: efficacy of voriconazole and review. **Antimicrob Agents Chemother**. 2008.

PÉREZ, P.; RIBAS, J. C. Cell wall analysis. **Methods**, Amsterdam, v.33, n.3, p.245-251, 2004.

PINTO, M.R, BARRETO-BERGTER, E., TABORDA, C.P. Glycoconjugates and polysaccharides of fungal cell wall and activation of immune system. **Braz J Microbiol**, v.39, p.195–208, 2008.

PITT, J.I. *A laboratory guide to common Penicillium species*. North Ryde, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing. 1988.

POLAK, A. Virulence of *Candida albicans* mutants. **Mycoses**, Jan-Feb; 35(1-2): 9-16, 1992.

PONTES, Z.B.V.S., SILVA, A.D.F., LIMA, E.O., GUERRA, M.H., OLIVEIRA, N.M.C., CARVALHO, M.F.F.P., GUERRA, F.S.Q. Otomicoses: um estudo retrospectivo. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.75, cap.3, p.367-70, 2009.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; GUTIERREZ-CORREA, M.; JONES, B.; WILLIAMS, C. *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. **FEMS Microbiol. Lett**, v.324, p.89–97, 2011.

RAMAGE, G., MOWAT, E., JONES, B., WILLIAMS, C., LOPEZ- RIBOT, J. “Our current understanding of fungal biofilms fungal biofilms,” **Critical Reviews in Microbiology**, v.35, n.4, pp.340–355, 2009.

RAMAGE, G., MARTINEZ, J.P., LOPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Res.** 6:979–986. 2006.

RAMAGE, G., VANDE WALLE, K., WICKES, B.L., L’OPEZ- RIBOT, J.L. “Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms,” **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.9, pp.2475–2479, 2001.

RAPER, K.B., FENNELL, D.I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore, Williams and Wilkins. 1965.

RASMUSSEN, T.B., GIVSKOV, M. “Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects,” **Microbiology**, v.152, part 4, pp.895–904, 2006.

REX, J.H., PFALLER, M.A., WALSH, T.J., CHATURVEDI, V., ESPINEL-INGROFF, A., GHANNOUM, M.A., GOSEY, L.L., ODDS, F.C., RINALDI, M., SHEEHAN, D.J., WARNOCK, D.W. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, p.643, 2001.

ROBERT SANDER, M.D. Otitis Externa: A Practical Guide to Treatment and Prevention. **American Family Physician**, v.63, n.5, p.927-936, 2001.

RODRÍGUES-TUDELA, J.L., MARTINEZ-SUÁREZ, J.V. **J. Antimicrob. Chemother**, v.35, p.739, 1995.

ROILIDES, E., KATSIFA, H., WALSH, T.J. Pulmonary host defenses against *Aspergillus fumigatus*. **Res. Immunol.**, 149, 454-465, 1998.

RUIZ, L.S., KHOURI, S., HAHN, R.C., SILVA, E.G., OLIVEIRA, V.K.P., GANDRA, R.F., PAULA, C.R. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children’s hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. **Mycopathologia**, v.175, p.231–239, 2013.

RUTT, A.L., SATALOFF, R.T. *Aspergillus* otomycosis in an immunocompromised patient. **Ear Nose Throat Journal**, v.87, n.11, p.622-623, 2008.

SAFFER, M., BELLIZIA NETO, L. Otite Externa. In:\_\_\_\_\_IV **Manual de Otorrinolaringologia Pediátrica da IAPO**. São Paulo: Lis Gráfica e Editora. p.187-190, 291p, 2006.

SAMSON, R.A., FRISVAD, J.C. *Penicillium* Subgenus *Penicillium*: new Taxonomics Schemes, Mycotoxins and Other Extrolites. **Studies in Mycology**, cidade, v.49, p.1-260. 2004.

SANTOS, P.F. et al. Achados otomicrocópicos e histológicos da miringoesclerose induzida em ratos: estudo crítico de um modelo experimental. **Rev Bras Otorrinolaringol**, cidade, v.71, n.5, p.668-74, 2005.

SARVAN, R.R., KIKANI, K.M., MEHTA, S.J., JOSHI, P.J. Clinico-mycological study of otomycosis. **International Journal of Biological & Medical Research**, v.3, n.4, p.2469-2470, 2012.

SEPHIDGAR, A., KYAKAJOURI, K., MEYRZAEI, M., SHARIFI, F. Fungal infection of external ear in otomycosis. **J Babol Med Sci**, v.13, p.25-9, 2001.

SETHI, A., SINGH, I., AGARWAL, A.K., SAREEN, D. Pneumatization of Mastoid Air Cells: Role of Acquired Factors. **International Journal of Morphology**, v.24, n.1, p.35-38, 2006.

SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1ºed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap.4 e 26, p.37 e 276, 408p. 2004.

SIH, T. Otite externa. Passages de Paris. p. 2166-71. 2005.

SIMÕES, M., SIMÕES, L.C., VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.573–583, 2010.

SUBISSI, A., MONTI, M., TOGNI, G., MAILLAND, F. Ciclopirox Recent Nonclinical and Clinical Data Relevant to its Use as a Topical Antimycotic Agent. **Drugs**, v.70, n.16, 2010.

SZIGETI, G., KOCSUBE, S., DOCZI, I., BEREZKI, L., VAGVÖLGYI, C., VARGA, J. Molecular Identification and Antifungal Susceptibilities of Black *Aspergillus* Isolates from Otomycosis Cases in Hungary. **Mycopathologia**, v.174, p.143–147, 2012.

SNELL, R.S. **Anatomia Clínica para Estudantes de Medicina**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap.11, p.692-698, 857p.1999.

SOARES, M.M.S.R., CURY, A.E. *In vitro* activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with *tinea pedis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.2, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE OTORRINOLARINGOLOGIA. **Tratado de Otorrinolaringologia**. 1ª ed. São Paulo: Roca. v.5, cap.2 , p.38-49, 3984p. 2003.

SREEPADA, G.S., KWARTLER, J.A. Skull base osteomyelitis secondary to malignant otitis externa. **Current Opinion Otolaryngology Head Neck Surgery**, v.11, p.316-23, 2003.

STERN, J.C., LUCENTE, F.E. Otomycosis. **Ear, Nose and Throat Journal**, v.87, p.804-10, 2008.

STURGULEWSKI, S.K., BANKAITIS, A.U., KLODD, D.A., HABERKAMP, T. What's still growing on your patient's hearing aids? **The Hearing Journal**, v.159, p.8-48, 2006.

TESTA, J.R.G., VICENTE, A.O., ABREU, C.E.C.; BENBASSAT, S.F., ANTUNES, M.L., BARROS, F.A. Colesteatoma causando paralisia facial. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.69, n.5, p.657-62, 2003.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O.F., CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3ªed. São Paulo: Atheneu. cap.57, p.418-419, 586p.2002.

TRÉ-HARDY, M., VANDERBIST, F. TRAORE, H., DEVLEESCHOUWER, M.J. "In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures," **International Journal of Antimicrobial Agents**, cidade, v.31, n.4, pp.329–336, 2008.

UMAMAHESHWARI, R.B., JAIN, N.K. Receptor mediated targeting of lectin conjugated gliadin nanoparticles in the treatment of *Helicobacter pylori*. **J Drug Target**, v.11, p.415–24, 2003.

VENNEWALD, I., SCHONLEBE, J., KLEMM, E. Mycological and histological investigations in humans with middle ear infections. **Mycoses**, v.46, p.12–18, 2003.

VENNEWALD, I., KLEMM, E. Otomycosis: Diagnosis and treatment. **Clinics in Dermatology**, v.28, p.202–211, 2010.

VISWANATHA, B., SUMATHA, D., VIJAYASHREE, M.S. Otomycosis in immunocompetent and immunocompromised patients: comparative study and literature review. **Ear Nose Throat J.**, v.91, n.3, p.114-21, 2012.

YAVO, W., KASSI, R.R., KIKI-BARRO, P.C., BAMBA, A., KPLÉ, T., MENAN, E.I., EHOUE, F., KONÉ, M. Prevalence and risk factors for otomycosis treated in the hospital setting in Abidjan (Ivory Coast). **Med Trop (Mars)**, v.64, cap.1, p.39-44, 2004.

YENISEHIRLI, G., BULUT, Y., GÜVEN, M., GÜNDAY, E. In vitro activities of fluconazole, itraconazole and voriconazole against otomycotic fungal pathogens. **The Journal of Laryngology & Otology**, v.123, n.9, p.978-81, 2009.

YOUNG, R.C.; BENNETT, J.E.; VOGEL, C.L.; CARBONE, P.P.; DEVITA, V.T. "Aspergillosis. The spectrum of the disease in 98 patients," **Medicine**, v.49, n.2, pp.147–173, 1970.

WANG, M.C., LIU, C.Y., SHIAO, A.S., WANG, T. Ear problems in swimmers. **Journal of the Chinese Medical Association**, v.68, n.8, p.347-352, 2005.

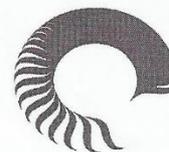
WEIR, S.J., PATTON, L., CASTLE, K., RAJEWSKI, L., KASPER, J., SCHIMMER, A.D. The repositioning of the anti-fungal agent ciclopirox olamine as a novel therapeutic agent for the treatment of haematologic malignancy. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v.36, n.2, p.128-34, 2011.

ZABEL, R. A., MORRELL, J. J. **Wood microbiology: decay and its prevention**. Academic Press. 1<sup>a</sup> ed. 1992.

## ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA/UFPE)

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br



Recife, 03 de abril de 2013.

Ofício nº 555/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Profª Rejane Pereira Neves**  
Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Micologia-UFPE  
Processo nº 23076.015954/2013-61

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Caracterização *in vitro* de Fungos Quanto ao Glicoconjugados da Parede Celular e Formação de Biofilme para Avaliação do Tratamento na Otomicose Experimental**".

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério de farmacologia e Fisiologia/UFPE. Animais: ratos Wistar; Peso: 200-400g; sexo: fêmeas; nº total de animais: 48 ratos.

Atenciosamente,

 Prof. Maria Teresa Jansem  
Presidente do CEEA

---

CCB: Integrar para desenvolver