

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IMUNOLOGIA E DOENÇAS
INFECTO-PARASITÁRIAS**

Jéssica Mara de Assis Chagas

**Perfil de susceptibilidade aos agentes antifúngicos de isolados da microbiota
intestinal de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos**

Juiz de Fora

2022

Jéssica Mara de Assis Chagas

Perfil de susceptibilidade aos agentes antifúngicos de isolados da microbiota intestinal de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, na área de Imunologia e Doenças infecto-parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Galuppo Diniz

Coorientador: Profa. Dra. Francis Moreira Borges

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Chagas, Jéssica Mara de Assis.

Perfil de susceptibilidade aos agentes antifúngicos de isolados da micobiota intestinal de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos / Jéssica Mara de Assis Chagas. -- 2022.

93 p.

Orientador: Cláudio Galuppo Diniz

Coorientador: Francis Moreira Borges

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2022.

1. Resistência aos antifúngicos. 2. Obesidade. 3. Micobiota intestinal. 4. Xenobióticos. I. Diniz, Cláudio Galuppo, orient. II. Borges, Francis Moreira, coorient. III. Título.

Jessica Mara de Assis Chagas

Perfil de susceptibilidade aos agentes antifúngicos de isolados da microbiota intestinal de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutrófico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e doenças infectoparasitárias.

Aprovada em 16 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Francis Moreira Borges
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Alessandra Barbosa Ferreira Machado
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Carolina dos Santos Fernandes Silva
Universidade Presidente Antônio Carlos

Juiz de Fora, 28/11/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Galuppo Diniz, Professor(a)**, em 16/12/2022, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Barbosa Ferreira Machado, Professor(a)**, em 16/12/2022, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Francis Moreira Borges, Professor(a)**, em 16/12/2022, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina dos Santos Fernandes da Silva, Usuário Externo**, em 30/01/2023, às 11:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ujf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1056245** e o código CRC **FA684FAA**.

DESENVOLVIMENTO

Centro de Estudos em Microbiologia
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

COLABORAÇÃO

Maycon Guerra de Oliveira, Esp.
Marjorie Raquel Anariba Sarmiento, MSc.
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, ICB/UFJF
Thaís Oliveira de Paula, MSc.
Laboratório de Análises Clínicas, Universidade Federal de Viçosa

APOIO FINANCEIRO

FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CAPES:
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tantas oportunidades concedidas, pela força e sabedoria para conclusão deste trabalho.

Agradeço aos meus orientadores Prof. Dr. Claudio Galuppo Diniz e Profa. Dra. Francis Moreira Borges pela oportunidade, confiança, paciência e disponibilidade. Obrigada por compartilharem conhecimento e por acreditarem em meu trabalho.

A Ms. Marjorie Raquel Anariba Sarmiento e Ms. Thaís Oliveira de Paula pelas contribuições, meus sinceros agradecimentos.

A Maicon Guerra de Oliveira pela amizade e pela companhia em cada dia de bancada. Aos professores, alunos da pós-graduação, alunos de iniciação científica, técnicos administrativos em educação do Centro de Estudos em Microbiologia agradeço pela paciência e ensinamentos.

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado e me incentivaram durante toda a escrita deste trabalho. Em especial a Ana Heloísa pelo apoio, carinho e amizade.

À Arthur, por todo amor e incentivo. Você e a Nina fazem meus dias mais leves.

Aos meus familiares, especialmente aos meus pais, Donizete e Patrícia e minha irmã Amanda pelo amor e apoio. Vocês são minha força e inspiração!

RESUMO

A resistência aos antifúngicos é um problema emergente de saúde pública que envolve as diretrizes de saúde única em decorrência de sua identificação em nichos ambientais, animais e em humanos. A microbiota intestinal é um ecossistema complexo que pode sofrer influência da composição dos alimentos ingeridos, atividade física, ritmo circadiano e utilização de xenobióticos. A capacidade de resposta ao desequilíbrio da comunidade intestinal apresenta uma limitação e ao ultrapassar este estado ocorre a disbiose. A obesidade pode provocar alterações na composição da microbiota intestinal levando à disbiose. A resistência dos fungos aos antimicrobianos é um problema crescente, relevante e, ainda, pouco explorado. O arsenal terapêutico ainda é limitado e pode ser considerado um fator agravante para aumento de mortalidade. Desta forma o objetivo central da pesquisa foi avaliar, comparativamente, o perfil de susceptibilidade de leveduras isoladas de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos e estabelecer correlações com parâmetros antropométricos, bioquímicos e nutricionais. A partir de amostras previamente isoladas de um estudo anterior, 43 leveduras da microbiota intestinal de 25 voluntários eutróficos, com sobrepeso e obesos tiveram o perfil de susceptibilidade definido para as principais drogas utilizadas para tratamento de infecções sistêmicas. A resistência mais predominante foi ao itraconazol (81,39%), seguida da caspofungina (67,44%), fluconazol e voriconazol apresentaram resistência de 39,53,5% e 32,55%, respectivamente. Todas as leveduras apresentaram sensibilidade a anfotericina B. Os isolados dos grupos obeso e sobrepeso apresentaram maior número de isolados resistentes ao itraconazol e o grupo eutrófico maior número de isolados resistentes à caspofungina. Desta forma, podemos sugerir que o ecossistema intestinal é um ambiente favorável à pressão seletiva de fenótipos fúngicos resistentes e novos estudos são necessários para compreender a relação entre fenótipos de resistência e a obesidade.

Palavras chaves: resistência aos antifúngicos, obesidade, microbiota intestinal, xenobióticos.

ABSTRACT

Antifungal resistance is an emerging public health issue that involves One Health associated with identification in environmental, animal, and human niches. The intestinal microbiota is a complex ecosystem that can be influenced by the composition of ingested food, physical activity, circadian rhythm and use of xenobiotics. The ability to respond to imbalance in the intestinal community presents a limitation and when this state is overcome, dysbiosis occurs. Obesity can cause changes in the composition of the intestinal microbiota leading to dysbiosis. The resistance of fungi to antimicrobials is a growing, relevant and still little explored problem. The therapeutic arsenal is still limited and can be considered an aggravating factor for increased mortality. Thus, the main objective of the research was to comparatively evaluate the susceptibility profile of yeasts from obese, overweight and eutrophic individuals and to establish correlations with anthropometric, biochemical and nutritional parameters. Based on a previous sample, from a previous study, 43 yeasts from the intestinal mycobiota of 25 eutrophic, overweight and obese volunteers had their susceptibility profile defined for the main drugs used to treat systemic elderly. The most predominant resistance was to itraconazole (81.39%), followed by caspofungin (67.44%), fluconazole and voriconazole showed resistance of 39.53.5% and 32.55%, respectively. All yeasts showed sensitivity to amphotericin B. The obese and overweight groups showed a greater number of isolates resistant to itraconazole and the eutrophic group a greater number of isolates resistant to caspofungin. Thus, we can suggest that the intestinal ecosystem is a favorable environment for the selective pressure of resistant fungal phenotypes and further studies are needed to understand the relationship between resistance phenotypes and obesity.

Keywords: antifungal resistance, obesity, intestinal mycobiota, xenobiotics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Cronologia do desenvolvimento das principais drogas antifúngicas	14
Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de ação dos antifúngicos na célula fúngica	16
Figura 3: Principais vias de resistência em patógenos fúngicos aos derivados azólicos e a equinocandinas	25
Figura 4: Principais vias de resistência em patógenos fúngicos aos polienos e aos análogos da pirimidina.	26
Figura 5: Principais fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal .	31
Figura 6: Relação entre a disbiose e a obesidade	33
Figura 7: Mecanismos da modulação da inflamação crônica de baixo grau pela microbiota intestinal na obesidade	37
Figura 8: Influência da ingestão de xenobióticos no trato gastrointestinal humano...	38
Figura 9: Potenciais vias de entrada dos antifúngicos no ambiente.....	40
Figura 10: Potenciais veiculadores de resistência aos antimicrobianos associados as diretrizes de saúde única	41
Figura 11: Conceito de saúde única.....	42
Figura 12: Correlação entre a média de consumo de alimentos de acordo com o grau de processamento. Letras diferentes acima das barras de erro indicam resultados com diferença estatística ($p < 0,05$), de acordo com o teste ANOVA two-way	59
Figura 13: Distribuição de xenobióticos (medicamentos, cigarros e adoçante utilizado pelos participantes distribuídos por grupos (eutrófico, sobrepeso e obeso).....	60
Figura 14: Comparação entre os perfis de resistência e sensibilidade de todas as leveduras. Resultados com diferença estatística ($p < 0,05$), de acordo com o teste qui-quadrado	63
Figura 15: Perfil de resistência x perfil de sensibilidade de <i>Candida sp.</i> Resultados com diferença estatística ($p < 0,05$), de acordo com o teste qui-quadrado	63
Figura 16: Perfil de resistência x sensibilidade das demais leveduras. Resultados com diferença estatística ($p < 0,05$), de acordo com o teste qui-quadrado	64
Figura 17: Perfil de resistência do Complexo C. parapsilosis. Resultados com diferença estatística ($p < 0,05$), de acordo com o teste qui-quadrado.....	64
Figura 18: Perfil de susceptibilidade das leveduras distribuídas por grupo. Resultados com diferença estatística ($p > 0,05$) para o grupo obeso e sobrepeso, de acordo com o teste qui-quadrado.....	65
Figura 19: Análise do componente principal (PCA) entre o uso de xenobióticos, Índice multirresistência às drogas e os parâmetros clínicos, nutricionais e antropométricos dos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso. Círculos verdes: eutróficos; círculos amarelos: sobrepesos; círculos vermelhos: obesos. Abreviaturas: CT: colesterol total, IN: insulina basal, HG: hemoglobina, MAR: índice de multirresistência, NA: alimentos in natura, MP: minimamente processados, IC: ingredientes culinários, PR: alimentos processados, UL: ultraprocessados, PT: proteínas, LP: lipídeos, FB: fibras, XB: xenobióticos, IMC: índice de massa corporal, CA: circunferência abdominal, CC: circunferência da cintura, CQ: circunferência quadril, CC/CA: relação circunferência da cintura e circunferência do quadril.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classes de drogas, alvos terapêuticos, mecanismos de ação de drogas e principais mecanismos de resistência	23
Tabela 2: Faixas diâmetro da zona de inibição do controle de qualidade com leitura após 24 horas.....	47
Tabela 3: Interpretação da zona de inibição dos halos para a droga anfotericina B .	50
Tabela 4: Interpretação da zona de inibição dos halos para a droga Fluconazol.....	50
Tabela 5: Interpretação da zona de inibição dos halos para a droga Voriconazol	51
Tabela 6: Interpretação da zona de inibição dos halos para a droga Itraconazol.....	51
Tabela 7: Interpretação da zona de inibição dos halos para a droga Caspofungina .	52
Tabela 8: Características antropométricas dos voluntários do estudo	55
Tabela 9: Dados laboratoriais dos voluntários do estudo	56
Tabela 10: Média dos macronutrientes ingeridos pelos participantes do estudo. Não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$)	58
Tabela 11: Número e prevalência (%) das linhagens de leveduras recuperadas da coleção de isolados do Centro de Estudos em Microbiologia distribuídas por grupo (eutrófico, sobrepeso e obeso).....	61
Tabela 12: Percentual de resistência das leveduras isoladas da micobiota intestinal distribuído por grupo	62
Tabela 13: Perfil de leveduras resistentes ao Fluconazol com distribuição por grupo (eutrófico, sobrepeso e obeso).....	66
Tabela 14: Perfil de leveduras resistentes ao voriconazol com distribuição por grupo (eutrófico, sobrepeso e obeso).....	67
Tabela 15: Perfil de leveduras resistentes ao Itraconazol com distribuição por grupo (eutrófico, sobrepeso e obeso).....	68
Tabela 16: Perfil de leveduras resistentes a Caspofungina com distribuição por grupo (eutrófico, sobrepeso e obeso).....	69
Tabela 17: Distribuição dos fenótipos de resistência das leveduras isoladas da micobiota intestinal dos voluntários do estudo	70
Tabela 18: Percentual das leveduras que apresentam multirresistência distribuídas por grupo (eutrófico, sobrepeso e obeso) calculadas pelo índice MAR.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABLC	Complexo lipídico de anfotericina B
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AMB-d	Desoxicolato de anfotericina B
CC	Circunferência cintura
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CYP450	Citocromo P450 mitocondrial
DIIs	Doenças inflamatórias intestinais
EDCS	Desreguladores endócrinos
HSP90	Proteína do choque térmico 90
IMC	Índice de massa corporal
IMDs	Inibidores de desmetilação de esteróis
L-AMB	Anfotericina B lipossomal
MAR	Índice multirresistência aos antimicrobiana
OMS	Organização mundial da saúde
QDEs	Produtos químicos disruptores endócrinos
QDMs	Produtos químicos desreguladores endócrinos
QFA	Questionário de frequência alimentar
RAF	Resistência aos antifúngicos
RAM	Resistência aos antimicrobianos
RCQ	Relação cintura-quadril
THG	Transferência horizontal de genes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 DROGAS ANTIFÚNGICAS.....	14
2.1.1 Polienos.....	17
2.1.2 Análogos da pirimidina.....	18
2.1.3 Derivados Azólicos.....	18
2.1.4 Equinocandinas.....	19
2.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS.....	20
2.2.1 Superexpressão da atividade das bombas de efluxo.....	27
2.2.2 Alterações nos alvos de drogas.....	28
2.2.3 Modulação das respostas ao estresse.....	28
2.4 MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA.....	29
2.4.1 Microbiota intestinal e doença.....	32
2.5 OBESIDADE.....	33
2.5.1 Obesidade e microbiota intestinal.....	35
2.6 XENOBIÓTICOS.....	37
2.6.1 Microbiota intestinal e xenobióticos.....	38
2.6.2 Xenobióticos, meio ambiente e saúde única.....	39
3.OBJETIVO	44
3.1 OBJETIVO GERAL.....	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	45
4.2 COLETA DE DADOS E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	45
4.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ÀS DROGAS ANTIFÚNGICAS.....	47
4.3.1 Padronização do experimento.....	47
4.3.2 Preparação do inóculo.....	47
4.3.3 Inoculação na placa.....	48
4.3.4 Aplicação de discos na superfície do ágar inoculado.....	48
4.3.5 Interpretação das zonas de inibição.....	48
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53

5. RESULTADOS.....	54
5.1 CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS, NUTRICIONAIS E LABORATORIAIS DOS PARTICIPANTES.....	54
5.2 UTILIZAÇÃO DE XENOBIÓTICOS PELOS PARTICIPANTES.....	59
5.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DAS LEVEDURAS ISOLADAS DA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA.....	60
5.4 FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA DAS LEVEDURAS ISOLADAS DA MICROBIOTA INTESTINAL E MULTIRRESISTÊNCIA ÀS DROGAS.....	69
6 DISCUSSÃO.....	73
7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
REFERÊNCIA.....	82
ANEXO A - Parecer do comitê de ética em pesquisa- UFJF.....	90
ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	92

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A resistência aos antimicrobianos é reconhecida pelo conceito saúde única como um problema de saúde global que envolve seres humanos, animais e o meio ambiente em decorrência do uso indiscriminado de antimicrobianos para tratamento de infecções, persistência de resíduos antimicrobianos no meio ambiente e a presença de microrganismos resistentes em todos os nichos humano-animal-ambiental.

O arsenal terapêutico antifúngico disponível para o tratamento das infecções é significativamente limitado, sendo utilizado na prática clínica apenas quatro classes de drogas para tratamento de infecções sistêmicas: análogos da pirimidina, polienos, azóis e as equinocandinas. Embora existam poucas drogas antifúngicas para tratamento de infecções seu uso generalizado em infecções humanas e animais associado à utilização de fungicidas na agricultura contribuem com o fenômeno de pressão seletiva atuando sobre a comunidade fúngica na microbiota humana e no meio ambiente promovendo a seleção e disseminação de resistência.

A microbiota intestinal humana é composta por espécies fúngicas originadas, em sua maioria, da cavidade bucal ou como contaminantes naturais dos alimentos. A homeostase intestinal sofre constantes perturbações externas como mudanças na alimentação e utilização de diversos xenobióticos como os antimicrobianos e outros medicamentos. A capacidade de resposta às perturbações que ocorrem na microbiota intestinal apresenta uma limitação ao estado de equilíbrio entre as comunidades e ao ultrapassar este estado de equilíbrio ocorre a disbiose.

A disbiose intestinal está relacionada a doenças inflamatórias crônicas, a doenças que provocam inflamação de baixo grau como ocorre na obesidade e pode ser relacionada a utilização de diversos xenobióticos como adoçantes, medicamentos e aditivos químicos utilizados em alimentos ultraprocessados. A disbiose pode alterar a saúde do hospedeiro ao interferir na absorção de energia, Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC), ácidos biliares e interferir no eixo intestino-cérebro. Além disso, podem promover alterações da estrutura da comunidade fúngica com redução da diversidade conforme sugerem estudos recentes e do nosso grupo de pesquisa.

Por outro lado, a resistência aos antifúngicos é um problema clínico, crescente e de grande notoriedade, decorrente do aumento da utilização de drogas antifúngicas

no tratamento de infecções. Estudos prospectivos têm sido propostos a fim de contribuir de maneira mais ampla na vigilância epidemiológica, como tem acontecido com a resistência bacteriana às drogas, mas dados referentes ao perfil de susceptibilidade de fungos isolados da microbiota intestinal residente humana de voluntários com diferentes classificações de índice de massa corporal (IMC) são inexistentes.

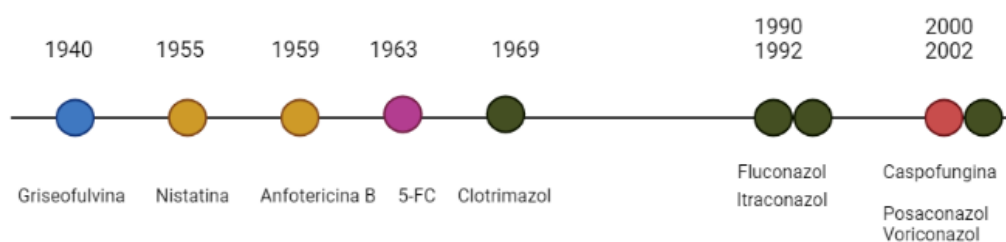
Assim, dando continuidade aos estudos de investigação da estrutura da comunidade fúngica no trato gastrointestinal humano, esse estudo é proposto, de maneira inovadora para se avaliar o perfil de susceptibilidade a antifúngicos de interesse clínico-microbiológico de leveduras isoladas da microbiota intestinal de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos. Além de associar a características antropométricas, clínicas e nutricionais de maneira comparativa entre os grupos analisados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DROGAS ANTIFÚNGICAS

As drogas antifúngicas disponíveis para tratamento de infecções sistêmicas apresentam limitação em decorrência da resistência emergente às drogas e número limitado de classes de drogas antifúngicas disponíveis. A maioria das drogas antifúngicas foi desenvolvida nas últimas três décadas (Figura 1) com quatro classes disponíveis para terapia sistêmica: os polienos, triazóis, equinocandinas e fluoropirimidinas (CESARE, et al. 2020; HOUST, et al. 2020; KIM, et al. 2022).

Figura 1: Cronologia do desenvolvimento das principais drogas antifúngicas



Fonte: HOUST (2020).

A griseofulvina foi o primeiro antifúngico desenvolvido originado do *Penicillium griseofulvum* e é empregada para tratamento de micoses superficiais e cutâneas, seu mecanismo de ação envolve a interferência na polimerização da tubulina intracelular da estrutura fúngica (LAMBERT, 2022).

A griseofulvina foi desenvolvida em 1940, até então os medicamentos disponíveis para tratamento de infecções fúngicas incluíam iodeto de potássio, ácido undecilênico e corantes fenólicos, medicamentos pouco eficazes para tratamento efetivo de infecções fúngicas (LAMBERT, 2022).

Os polienos foram introduzidos em 1955 com o desenvolvimento da nistatina. A anfotericina B, um polieno utilizado para tratamento de infecções sistêmicas foi licenciada em 1959 representando um marco científico importante no final do século XX (CAVASSIN, et al. 2021; LAMBERT, et al. 2022; KIM, et al. 2022).

A flucitosina, um análogo da pirimidina, foi sintetizado em 1957 como droga de ação antitumoral e em 1963 foi descoberta sua ação antifúngica para tratar candidíase e criptococose humana (HOUST, et al. 2020; LOYSE, et al. 2013).

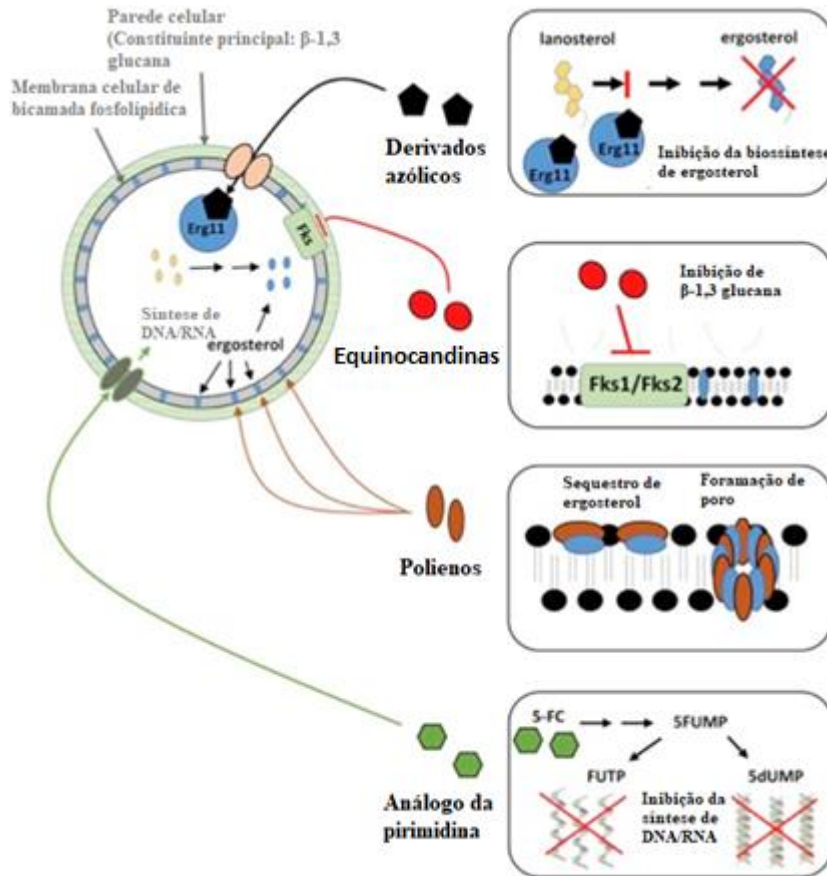
O primeiro derivado azólico a ser desenvolvido foi o clotrimazol em 1958, dando início a diversas pesquisas para o desenvolvimento de novos derivados azólicos. O clotrimazol foi o primeiro a ser comercializado em 1969 e em 1974, outra indústria farmacêutica lançou o miconazol e o econazol (SHAFIEI, et al. 2020).

No entanto, a introdução de um anel triazol substituindo a fração de imidazol nas estruturas dos azóis trouxe maior seletividade das drogas para a enzima CYP fúngica. O fluconazol e o itraconazol são triazóis de primeira geração desenvolvidos em 1990 e 1992, respectivamente. Em 2002 foram aprovados pelo FDA (Food and Drugs Administration), agência americana de controle de medicamentos, o posaconazol e o voriconazol, triazóis de segunda geração 30 vezes mais potentes para *C. albicans* e ativo para *Aspergillus* spp. (SHAFIEI, et al. 2020).

As equinocandinas são a classe de antifúngicos com desenvolvimento mais recente. A primeira equinocandina aprovada para uso clínico foi a caspofungina em 2002. Além da caspofungina, existem outras equinocandinas disponíveis para tratamento de infecções sistêmicas como a micafungina e a anidulafungina. (KIM, et al. 2022).

As quatro classes de drogas antifúngicas disponíveis para tratamento de infecções sistêmicas atuam em diferentes alvos na célula fúngica (Figura 2). Os polienos como a anfotericina B alteram a permeabilidade da membrana celular do fungo ligando-se ao ergosterol na superfície. Os azóis reduzem a atividade enzimática da lanosterol 14 α -desmetilase promovendo redução do ergosterol fúngico. As equinocandinas alteram a organização da parede celular ao ligarem-se a 1,3- β -glucana sintase. Enquanto os análogos da pirimidina inibem o metabolismo da pirimidina ao interromper a biossíntese de DNA e RNA das células fúngicas (FERNANDES, et al. 2021; HOUST, et al. 2020; MORIO, et al. 2017).

Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de ação dos antifúngicos na célula fúngica



Fonte: MORIO (2017).

A utilização de antimicrobianos em longo prazo promove efeitos prejudiciais ao organismo humano como redução da diversidade dos microrganismos presentes na microbiota intestinal promovendo alterações metabólicas, aumento da susceptibilidade do intestino à colonização, indução da resistência aos antimicrobianos e disbiose (SCORZONI, et al. 2017; ZHENG, et al. 2020).

A disbiose da microbiota intestinal induzida por antimicrobianos provoca efeitos negativos em diversas funções do hospedeiro com hiperativação de macrófagos intestinais, expansão de células T auxiliares pró-inflamatórias e aumenta a susceptibilidade a infecções, proliferação ou apoptose de células intestinais, enterócitos e células endócrinas (ZHENG, et al. 2020).

Os antimicrobianos podem promover desequilíbrio da comunidade microbiana quantitativamente e qualitativamente com redução ou eliminação de microrganismos

alvos e permitindo que espécies resistentes ganhem espaço e nutriente no intestino humano (KONSTANTINIDIS, et al. 2020).

2.1.1 Polienos

A classe dos antifúngicos polienos é composta por anfotericina B, anfotericina A e nistatina. A anfotericina B é a droga central da família dos polienos descoberta em 1956 e aprovada para utilização em 1959, sua produção é feita à partir da bactéria *Streptomyces nodosus* (HOUST, et al., 2020; SANTAMARÍA, et al. 2022).

A anfotericina B é uma molécula que possui um anel macrocíclico de 38 membros e quatro domínios: cadeia poliênica hidrofóbica de 14 carbonos; cadeia carbônica polihidroxilada com sete grupos de hidroxilas livres; cauda hidrofóbica com grupo hidroxila livre e uma cabeça polar com resíduos de conosamina e cadeia lateral com um grupo amino livre (SANTAMARÍA, et al. 2022).

O mecanismo de ação principal dos polienos ocorre pela ligação a um esteróide presente na membrana fúngica, o ergosterol, desencadeando um desequilíbrio da homeostase da concentração eletrolítica do meio celular seguida de morte celular (HOUST, et al., 2020; SANTAMARÍA, et al. 2022).

A anfotericina B apresenta um segundo mecanismo de ação pela indução do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) provocando danos ao DNA, na membrana, nas proteínas e na mitocôndria (HOUST, et al., 2020).

Existem três tipos de anfotericina B: o desoxicolato de anfotericina B (AMB-d), a anfotericina B lipossomal (L-AMB) e o complexo lipídico de anfotericina B (ABLC). As formulações a base de desoxicolato de sódio como principal excipiente apresentam mais eventos adversos e as formulações com base lipídicas menos eventos adversos. A utilização de acetaminofeno associado ou não a um anti-histamínico pode ser usada para tratar ou prevenir os eventos adversos (CAROLUS, et al. 2020; SANTAMARÍA, et al. 2022).

A anfotericina B apresenta um amplo espectro terapêutico sendo indicada para o tratamento de aspergilose, criptococose, blastomicose, candidíase sistêmica, coccidioidomicose, histoplasmose e mucormicose, todas em caso de infecções com risco de vida (CAROLUS, et al. 2020).

2.1.2 Análogos da pirimidina

Em 1957, o 5-fluorocitosina foi sintetizado inicialmente como agente antitumoral apresentando baixa atividade terapêutica. No entanto, anos depois em estudos *in vitro* apresentou atividade antifúngica passando a ser usado para tratamento de candidíase e criptococose. Apresenta boa penetração no trato urinário, cérebro, olhos e válvulas cardíacas (DELMA, et al. 2021; SANTAMARÍA, et al. 2022).

O 5-FC é um pró-fármaco transportado ativamente para o interior da célula fúngica por permeases de membrana onde ocorre sua ativação. No interior da célula fúngica o 5-FC é desanimado em 5-fluoracil (5-FU) pela enzima citosina desaminase. O 5-FU é então, convertido em 5-fluoro uridina monofosfato (FUMP) pela enzima uridina monofosfato pirofosforilase e em seguida para 5-fluoro uridina difosfato (FUDP) e na sequência em 5-fluoro uridina trifosfato (FUTP) que incorporado ao RNA inibe a síntese de proteínas. Ocorre também a conversão do 5-FU em 5-fluorodeoxyuridine monofosfato (FdUMP) pela enzima monofosfato pirofosforilase que inibe a biossíntese de DNA (DELMA, et al. 2021; WALL, LOPEZ-RIBOT, 2020).

A flucitosina apresenta alta toxicidade na medula óssea e no fígado e não é totalmente absorvida pelas células fúngicas. A terapia combinada é sempre indicada no tratamento de infecções sistêmicas. É ativa contra a maioria das leveduras como *Cryptococcus* e *Candida*, outros fungos também apresentam sensibilidade como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Phialophora*, *Cephalosporium*, *Sporothrix* e *Blastomyces* (CHANG, 2017; SANTAMARÍA, et al. 2022).

Os fungos demonstram comumente resistência a esta droga, desta forma, a monoterapia não é indicada e a administração deve ser feita de forma combinada com outros antifúngicos. A droga apresenta melhor atividade contra leveduras (WALL, LOPEZ-RIBOT, 2020).

2.1.3 Derivados Azólicos

Os derivados azólicos são associados a dois subgrupos: imidazólicos e triazólicos. Os imidazólicos apresentam um anel azólico com dois nitrogênios e os triazólicos são formados por anel de três nitrogênios (SANTAMARÍA, et al. 2022).

Os derivados azólicos atuam no citocromo P450 mitocondrial (CYP450) monooxigenase dependente de 14- α -desmetilase por meio da desmetilação do lanosterol fúngico, precursor do esterol mais abundante nas membranas fúngicas, o ergosterol. O processo ocorre em duas etapas: primeiro ocorre a ligação do anel triazol ao ferro heme impedindo a oxidação do grupo metil. Em seguida, o acúmulo de 14- α -metil esteróis tóxicos e a depleção de ergosterol promovem a ação fungistática. (HOUST, et al. 2020).

Os azóis são fungistáticos em sua maioria, apresentando amplo espectro de atividade contra leveduras e fungos filamentosos. O fluconazol e o itraconazol são triazóis de primeira geração, a segunda geração de azóis apresenta perfil farmacológico melhorado com inclusão de voriconazol, posaconazol e isavuconazol (NAMI, et al. 2019; SANTAMARÍA, et al. 2022).

O fluconazol é indicado como medicamento de primeira linha e sua ação é mais efetiva se o paciente não for tratado previamente com outros azólicos ou colonizados por espécies resistentes (NAMI, et al. 2019; WALL, LOPEZ-RIBOT, 2020).

Voriconazol e posaconazol são triazóis de segunda geração de amplo espectro e são usados no tratamento e profilaxia da aspergilose invasiva. Apresentam eficácia contra *Candida*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus* (HOKKEN, et al. 2019; SANTAMARÍA, et al. 2022).

O posaconazol é um inibidor potente da desmetilação do esterol C14 apresentando amplo espectro de atividade e apresenta menor interação medicamentosa que os demais azóis (NAMI, et al. 2019).

2.1.4 Equinocandinas

As equinocandinas foram desenvolvidas na década de 90 e são análogos modificados das pneumocandinas produzidas a partir da fermentação de uma variedade de microrganismos (CESARE, et al. 2020; HOUST, et al., 2020).

A anidulafungina é derivada da equinocandina B0 produzida por *Aspergillus nidulans*; a caspofungina da pneumocandina B0 produzida por *Glarea lozoyensis* e a micafungina da pneumocandina A0 produzida por *Coleophora empetri* (CESARE, et al. 2020; HOUST, et al., 2020).

A administração das equinocandinas ocorre por via intravenosa devido ao tempo de meia-vida do fármaco. A administração ocorre em intervalos diferentes para cada droga: a anidulafungina é administrada a cada 24 horas, a caspofungina e a micafungina de 10-17 horas (MURPHY, BICANIC; 2021).

As equinocandinas apresentam a estrutura de hexapeptídeos cíclicos e são drogas antifúngicas responsáveis pela inibição da síntese da parede celular fúngica. Ligam-se de forma não competitiva a enzima 1,3- β -D-glucano síntese, este complexo enzimático ao ser inibido compromete a conversão de uridina difosfato de glicose em β -D-glucano tornando a parede celular permeável (SANTAMARÍA, et al. 2022; WIEDERHOLD, 2017).

Fungos do gênero *Aspergillus* e a maioria das leveduras do gênero *Candida* são os únicos suscetíveis às equinocandinas (SANTAMARÍA, et al. 2022; REVIE, et al. 2018).

As equinocandinas são indicadas para o tratamento de candidíase invasiva em pacientes imunocomprometidos ou para pacientes que foram tratados previamente com derivados azólicos e que o fungo em questão apresentou resistência à droga (WIEDERHOLD, 2017).

2.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS

A disseminação de espécies patogênicas resistentes aos antifúngicos disponíveis para terapia medicamentosa é uma preocupação emergente em todo o mundo. A utilização de antimicrobianos de amplo espectro em pacientes com infecções fúngicas invasivas associado a diversas doenças como HIV/AIDS, tratamentos para câncer, transplantes de órgãos sólidos e mais atualmente aumento de casos de pacientes criticamente doentes com COVID-19 levam ao aumento de infecções fúngicas e conseqüentemente à resistência aos antifúngicos (MURPHY, BICANIC, 2021; STEVENSON, et al. 2022).

A frequência de relatos de linhagens fúngicas resistentes às drogas disponíveis aumentam a cada dia. Como exemplo, infecções sistêmicas atribuídas a variantes resistentes de fungos como *Aspergillus fumigatus*, patógeno onipresente, previamente sensível às drogas antifúngicas disponíveis; espécies patogênicas multirresistentes como a *Candida auris*, reportada pela primeira vez em 2009 e infecções em paciente

com COVID-19 associado a *Aspergillus* spp., *Candida auris* ou fungos da ordem *Mucorales* (FISHER, et al. 2018; HOKKEN, et al. 2019).

As falhas no tratamento são atribuídas a uma interação entre alterações imunológicas do hospedeiro, características fúngicas (diversidade morfológica celular, tolerância e resistência aos antifúngicos) e características das drogas antifúngicas como propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas, interações medicamentosas (FISHER, et al. 2022).

Além disso, a variação do método de reprodução de fungos patogênicos auxilia no desenvolvimento e disseminação de mecanismos de resistência durante a produção de conídios assexuados ou na formação dos esporos sexuais favorecendo a sobrevivência dos microrganismos mais resistentes (HOKKEN, et al. 2019).

Os mecanismos que envolvem a resistência aos antifúngicos são multifatoriais e dependem do hospedeiro e do microrganismo. Diversos mecanismos adaptativos de resistência foram identificados, entre eles os mecanismos de superexpressão do alvo de drogas, regulação positiva de transportadores de múltiplas drogas, ativação de respostas ao estresse e formação de biofilme. Outro mecanismo de resistência associado aos fungos é a transferência horizontal de genes (THG) que em eucariotos ocorre em menor proporção quando comparado aos procariotos (HOKKEN, et al. 2019; STEVENSON, et al. 2022).

Em fungos, a THG pode ocorrer pela proximidade entre espécies ecológicas, como exemplo, uma linhagem de levedura encontrada no vinho, a *Saccharomyces cerevisiae* EC118, recebeu 65 kb do material genético de *Zygosaccharomyces bailii*, um contaminante. Outra descrição associada a THF é a anastomose que é a fusão de fungos filamentosos pelos conídios em germinação permitindo que esta conexão atue como único indivíduo coordenado como regulação de água, nutrientes, moléculas de sinalização, núcleos e organelas e também a trocas genéticas (FITZPATRICK, 2012; HOKKEN, et al. 2019).

A formação de biofilme impede a difusão das drogas nas células fúngicas, conferindo à comunidade maior resistência aos antifúngicos. O biofilme pode ser formado em uma superfície pela associação de células microbianas em uma rede conferindo à comunidade microbiana proteção contra um ambiente estressor (HOKKEN, et al. 2019).

A resistência aos antifúngicos pode ser intrínseca (primária) ou adquirida (secundária). Na resistência intrínseca todos os isolados dentro de uma mesma

espécie apresentam resistência não relacionada à exposição prévia à antifúngicos. Um exemplo é a resistência intrínseca aos azóis relatada em *Candida glabrata* e *C. krusei*, resistência atribuída a bomba de efluxo de drogas pela superexpressão de transportadores ABC Cdr1, Pdh1, Yor1 e Snq2 (LEE, et al. 2021; HOUST, et al., 2020).

A resistência adquirida está associada à exposição do microrganismo aos antifúngicos em terapias de longo prazo, profilaxias generalizadas, utilização de antimicrobianos na agricultura, transferência horizontal de genes ou pressão seletiva do ambiente. O *Aspergillus fumigatus* é um exemplo de resistência adquirida, fungo ambiental previamente sensível às drogas antifúngicas disponíveis, que atualmente tem sido associado a infecções hospitalares apresentando perfil de multirresistência às drogas (HOUST, et al., 2020; MORIO, et al. 2017).

Existem apenas 4 classes de antifúngicos disponíveis para tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (Tabela 1). Os polienos como anfotericina B; análogos da pirimidina como a flucitosina; os derivados azólicos como fluconazol e itraconazol; e as equinocandinas como anidulafungina e caspofungina. A resistência às drogas antifúngicas foi relatada em todas as classes disponíveis para tratamento de infecções sistêmicas com variação da extensão da resistência entre as classes e espécies fúngicas e pode ocorrer de forma única ou de forma simultânea (MURPHY, BICANIC, 2021).

Tabela 1: Classes de drogas, alvos terapêuticos, mecanismos de ação de drogas e principais mecanismos de resistência

Classe da droga	Local do alvo	Alvo de drogas	Mecanismo de ação	Mecanismo de resistência
Derivados azólicos	Membrana celular	Lanosterol 14- α -desmetilase (Erg11p)	Acúmulo de 14- α -metil esteróis tóxicos e depleção de ergosterol	Superexpressão de bomba de efluxo
Equinocandinas	Parede Celular	1,3- β -D-glucano sintase	Inibição da síntese da parede celular fúngica com aumento da permeabilidade	Mutação em FKS1/2
Polienos	Membrana celular	ergosterol	Sequestro do ergosterol da membrana celular e desequilíbrio eletrolítico	Incorporação de esteróis não ergosterol na membrana celular
Análogos da pirimidina	Síntese de DNA e RNA	Citoplasma: Conversão do Pró-fármaco 5-FC em FUTP e FdUMP	Inibição do metabolismo da pirimidina	Mutação em UPRT, FCY1, FCY2, FUR1

5-FC: 5-fluorocitosina, FUTP: 5-fluorouridina trifosfato, FdUMP: 5-fluoro desoxi uridina monofosfato.

Fonte: MURPHY, BICANIC, 2021.

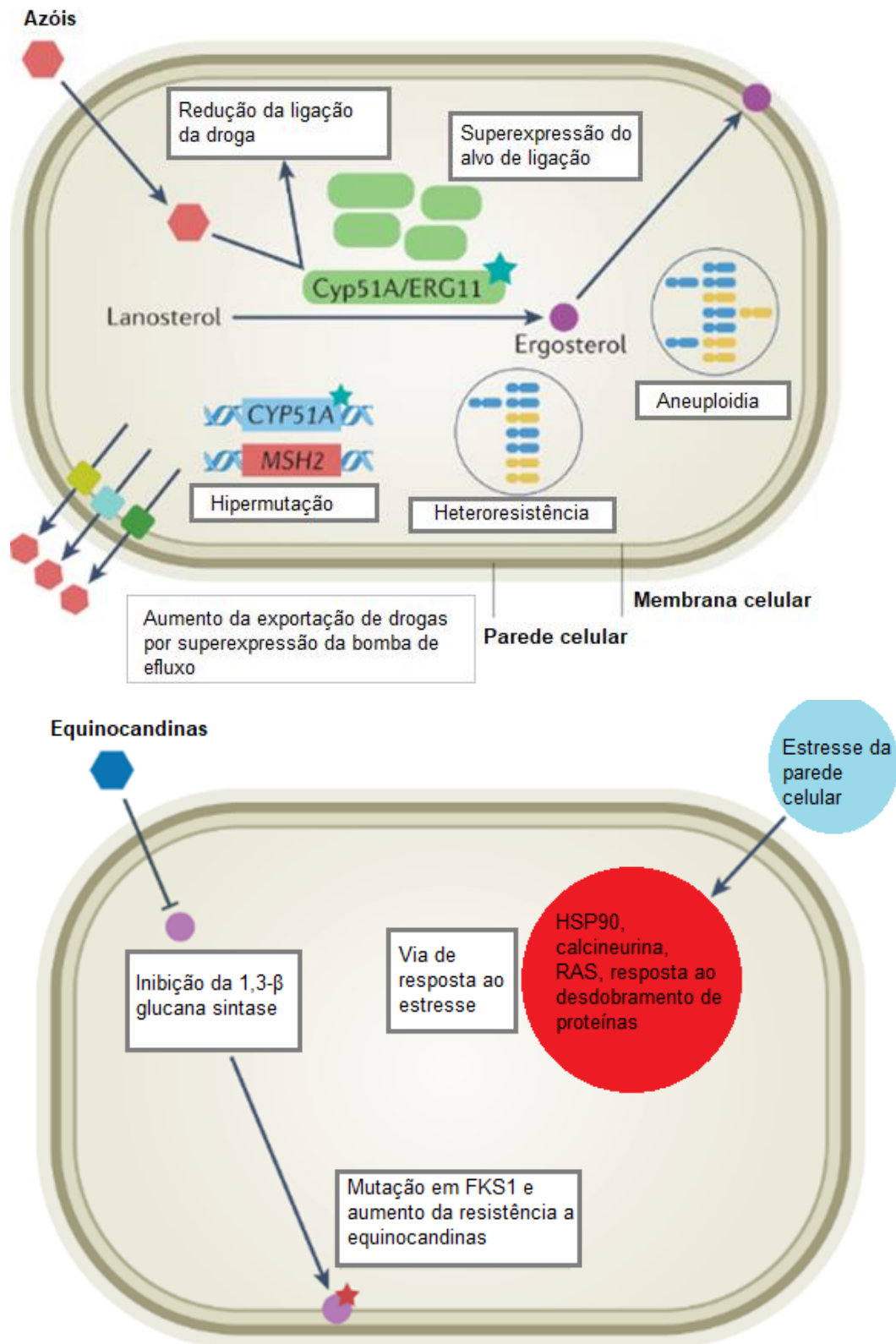
Os mecanismos principais de resistência aos derivados azólicos (Figura 3) ocorrem pelo aumento da bomba de efluxo dos fármacos nas células fúngicas e por

modificações na biossíntese de esteróis. A superexpressão do alvo da droga e as bombas de efluxo, em *Candida* sp. e *Cryptococcus neoformans* são os mecanismos mais comuns e ocorrem por aneuploidia (mudança no número de cromossomos) e hipermutação cromossômica e são mecanismos bem tolerados por fungos (FISHER, et al. 2022; SAH, et al. 2021).

As leveduras resistentes às equinocandinas (Figura 3) apresentam mutações no gene FKS1, resistência identificada em leveduras do gênero *Candida* sp. e *Fusarium* sp. Além disso, a parede celular pode sofrer estresse pela exposição à droga por meio da inibição da β -glucana sintase e ativação indireta das vias de Ca^{2+} /calcineurina ou proteína do choque térmico 90 (HSP90) são mecanismos relacionados à tolerância à droga. A proteína Hsp90 é uma chaperona molecular de uma família de proteínas conservadas (hsps) com acúmulo rápido no citosol em resposta ao calor e adversidades ambientais como drogas antifúngicas, estresse oxidativo e exposição a metais pesados (FISHER, et al. 2022; JACOB, et al. 2015).

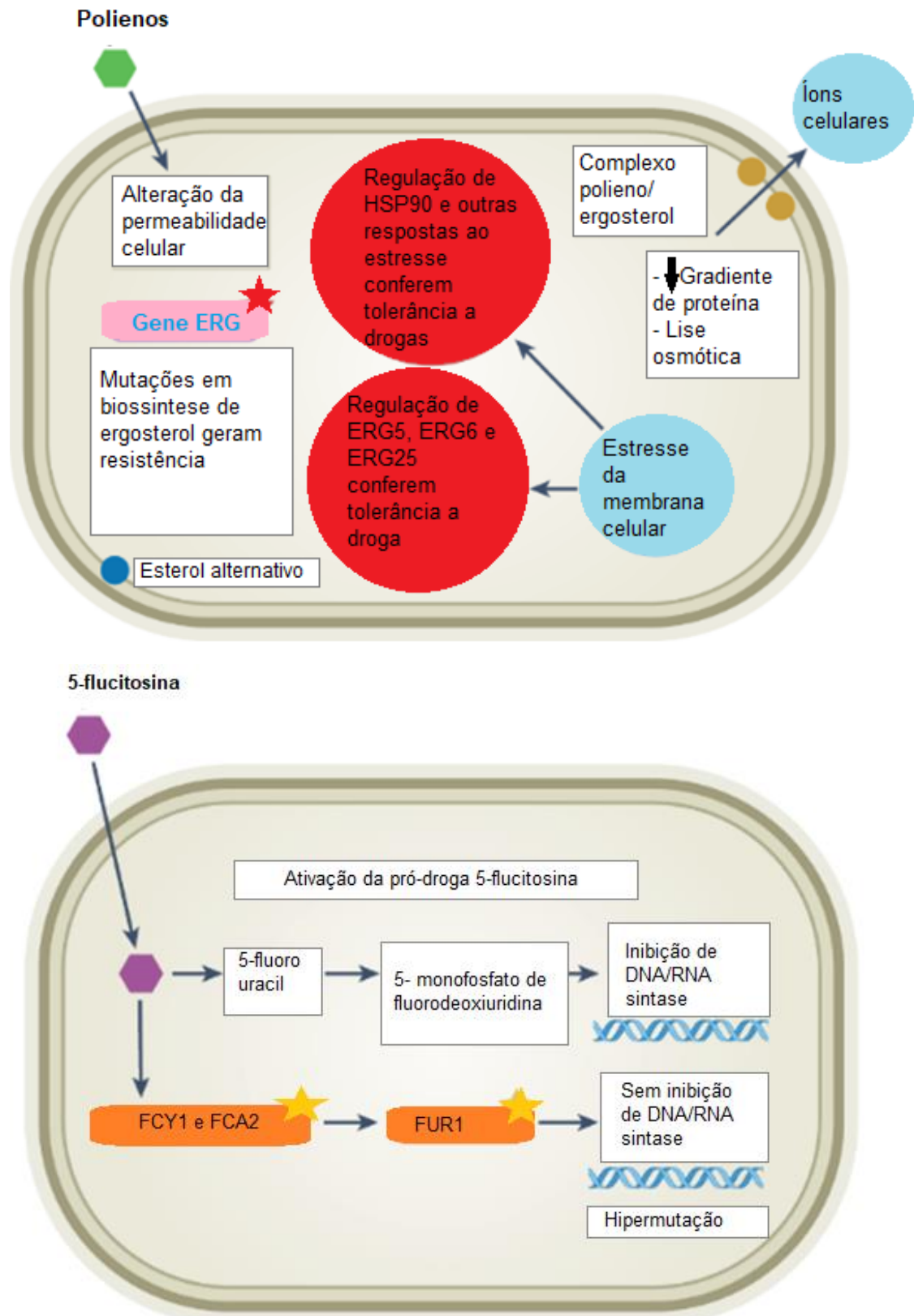
A resistência aos polienos (Figura 4) ocorre quando a célula fúngica apresenta mutação com perda da função em genes da biossíntese de ergosterol impedindo a formação do complexo ergosterol/polieno e assim promovendo a resistência à droga. A regulação positiva dos genes ERG5, ERG6, ERG25 e ativação indireta das vias Ca^{2+} /calcineurina ou HSP90 gerada pelo estresse da parede celular conferem a resistência à droga. A resistência à 5-flucitosina (Figura 4) ocorre através de mutações pontuais no gene alvo FCY1, mutação comum em *Candida* sp. (FISHER, et al. 2022).

Figura 3: Principais vias de resistência em patógenos fúngicos aos derivados azólicos e a equinocandinas



Fonte: FISHER (2022).

Figura 4: Principais vias de resistência em patógenos fúngicos aos polienos e aos análogos da pirimidina.



Fonte: FISHER (2022).

A capacidade de células fúngicas susceptíveis às drogas crescerem em concentrações acima da concentração inibitória mínima (CIM) é chamada de tolerância aos antifúngicos e está associada à resposta geral ao estresse. Os fungos apresentam evidente tolerância às drogas fungistáticas, como os derivados azólicos. No entanto, células fúngicas tolerantes aos polienos e as equinocandinas podem ser identificadas em decorrência da ativação da via do estresse da parede celular (LEE, et al. 2021; FISHER, et al. 2022).

2.2.1 Superexpressão da atividade das bombas de efluxo

A ativação de bombas de efluxo de drogas associada à membrana permite a resistência a diversas drogas. Os fungos apresentam dois tipos de bomba de efluxo, a superfamília de cassete de ligação de ATP (ABC) e a superfamília de facilitadores principais (MFS) (COWEN, et al. 2015).

Os azóis apresentam aumento da atividade de bombas de efluxo de fármaco como o mecanismo de resistência mais frequente em diferentes espécies de *Candida* sp. (FISHER, et al. 2022).

A superexpressão de dois transportadores ABC homólogos, CDR1 e CDR2 são associadas a resistência aos azóis em espécies de *Candida*. O mecanismo envolve a regulação positiva de transportadores de múltiplas drogas por meio da ligação entre os transportadores CDR1 e CDR2 do cassete de ligação de ATP com o facilitador MDR1 (MURPHY, BICANIC, 2021; REVIE, et al. 2018).

Os fungos ainda podem apresentar um mecanismo que aumenta a estabilidade do RNAm, a expressão de CDR1, codificando um transportador de efluxo de diversas drogas em *Candida albicans*. Neste contexto, o tempo de meia-vida do RNAm torna-se três vezes maior quando comparado a linhagens sensíveis (COWEN, et al. 2015).

As equinocandinas e os polienos atuam na parede e na membrana celular fúngica, a falta de mecanismos de resistência mediados por bombas de efluxo são atribuídas a incapacidade das drogas de entrarem no transportador de membrana das células fúngicas (LEE, et al. 2021).

2.2.2 Alterações nos alvos de drogas

A superexpressão da proteína alvo ocorre em decorrência da mutação de ganho de função em reguladores transcricionais ou duplicação de genes superando a capacidade de inibição da droga (MURPHY, BICANIC, 2021).

Espécies de *C. albicans* apresentam resistência aos azóis mediada por mutações de ganho de função nos principais reguladores transcricionais ERG11 promovendo uma superexpressão de Erg11 e sensibilidade reduzida a azóis pela inibição da via de biossíntese de ergosterol (MURPHY, BICANIC, 2021; REVIE, *et al.* 2018).

As células fúngicas apresentam ainda um mecanismo de resistência relacionado a substituição de aminoácidos no alvo da droga, ERG11, promovendo uma redução da afinidade de ligação da droga pela enzima lanosterol desmetilase o que confere resistência aos derivados azólicos (LEE, *et al.* 2021).

A resistência aos polienos ocorre por alterações em enzimas que reduzem a afinidade de ligação ao fármaco ou redução da concentração de ergosterol da membrana. Mutações em várias enzimas da biossíntese do ergosterol (ERG2, ERG3, ERG4, ERG5, ERG11) reduzem a susceptibilidade à anfotericina B (LEE, *et al.* 2021).

A susceptibilidade reduzida às equinocandinas em algumas espécies de *Candida* está relacionada quase exclusivamente a mutações pontuais em três regiões de *hotspots* FKS1 ou em menor frequência em mutações em FKS2 (COWEN, *et al.* 2015).

A substituição de aminoácidos em regiões altamente conservadas das subunidades FKS da glucano sintase confere às células fúngicas resistência às equinocandinas. O nível de resistência pode variar dependendo da mutação e do nível de expressão desse gene, um exemplo é a *Candida glabrata*, que ao expressar FKS2 depende de calcineurina. Uma estratégia terapêutica é a administração de inibidores de calcineurina concomitante ao uso de equinocandinas (REVIE, *et al.* 2018).

2.2.3 Modulação das respostas ao estresse

Os patógenos fúngicos estão sujeitos ao estresse por meio das alterações ambientais que incluem temperatura, pH e alterações dos níveis nutricionais

promovendo alterações da homeostase celular e causando estresse à célula fúngica. As drogas antifúngicas representam um estressor químico que desencadeia nos fungos um processo de reconhecimento, resposta e adaptação para sobreviver à adversidade gerada pelos antifúngicos (LEE, et al. 2021).

As mutações em ERG3 que codificam a enzima Δ -5,6-dessaturase, bloqueiam o acúmulo celular de 14- α -metil-3,6-dessaturase, um intermediário tóxico de esterol, gerando resistência aos azóis por resposta ao estresse promovendo uma alteração da biossíntese do ergosterol (LEE, et al. 2021; REVIE, et al. 2018).

Algumas espécies de *Aspergillus* e *Candida* apresentam ativação de vias de resposta ao estresse por Hsp90 o que aumenta o potencial de tolerância e resistência às equinocandinas (REVIE, et al. 2018; FISHER, et al. 2018).

O Hsp90 (proteína do choque térmico 90) é uma chaperona molecular essencial capaz de interagir com outras 20 co-chaperonas. A Hsp90 funciona como um capacitor para o armazenamento e liberação de variação genética e potencializador para rápido surgimento de novas características como resistência aos azóis em *C. albicans* (LEE, et al. 2021).

Os defeitos gerados na parede celular fúngica ao ser exposta pelas equinocandinas é detectado por proteínas transmembranares que facilitam a ativação da GTPase Rho1. A parede celular do fungo inicia um processo dinâmico e compensatório para aumentar a produção de um componente mediante a redução de outro componente (LEE, et al. 2021).

A resistência aos polienos é relatada como evento raro em espécies de *Candida* em decorrência dos custos de aptidão associados à aquisição de resistência. No entanto, as mutações de perda de função de ERG3 estão relacionadas à resistência simultânea entre polienos e azóis (COWEN, et al. 2015; LEE, et al. 2021).

2.4 MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

Alguns trabalhos, realizados por técnica de sequenciamento apontam que a colonização da microbiota humana saudável ocorre antes do nascimento, durante a gestação com a colonização microbiana da placenta. Além disso, após o parto ocorre uma transferência microbiana de mãe para filho pela exposição ao líquido amniótico, troca de substância umbilical com a mãe e por transferência do ambiente. A variação da composição da microbiota intestinal é dependente do modo de parto, idade

gestacional, dieta materna e genética do hospedeiro (BERNARDES, *et al.* 2020; SENN, *et al.* 2020; WU, *et al.* 2021; ZAKIS, *et al.* 2022).

O ecossistema intestinal é composto por bactérias, fungos, arqueias, vírus, protozoários nematoides. A microbiota intestinal representa um ecossistema complexo importante na relação de equilíbrio entre saúde/doença, fornecimento de resistência às infecções por microrganismos patogênicos, promoção da proliferação de células epiteliais, desenvolvimento do tecido linfóide, diferenciação do linfócito T e B e maturação de células dendríticas (CERDÓ, 2019; MITEV, TALESKI, 2019).

As bactérias representam o maior constituinte da microbiota intestinal humana com cerca de 90% de sua composição representada pelos filos Bacteroidetes e Firmicutes. O componente fúngico representa menos de 0,1% do total de microrganismos presentes na microbiota intestinal. No entanto, apresentam uma biomassa 100 vezes maior em volume que a biomassa de células bacterianas (GAO, *et al.* 2022; MITEV, TALESKI, 2019; WANG, 2022).

A microbiota intestinal assim como a microbiota bacteriana são fundamentais na absorção, decomposição e armazenamento dos nutrientes, síntese de vitaminas, modulação do metabolismo, imunorregulação, alteração da composição de ácidos graxos e defesa contra patógenos (AOUN, *et al.* 2020; FERROCINO, *et al.* 2022; YU, *et al.* 2022).

As interações entre fungos e bactérias na microbiota intestinal por mutualismo, comensalismo, amensalismo, parasitismo e competição podem ser os principais fatores determinantes da riqueza dos fungos (FERROCINO, *et al.* 2022).

A microbiota intestinal atua como imunoregulador essencial para a homeostase do microambiente intestinal. Enquanto as bactérias mantêm o controle do crescimento fúngico na microbiota intestinal, em troca, a capacidade de imunomodulação dos fungos modifica o crescimento bacteriano, promovendo o agravamento ou melhora de doenças afetando a reação do hospedeiro diante das infecções (GAO, *et al.* 2022; REINOLD, *et al.* 2022).

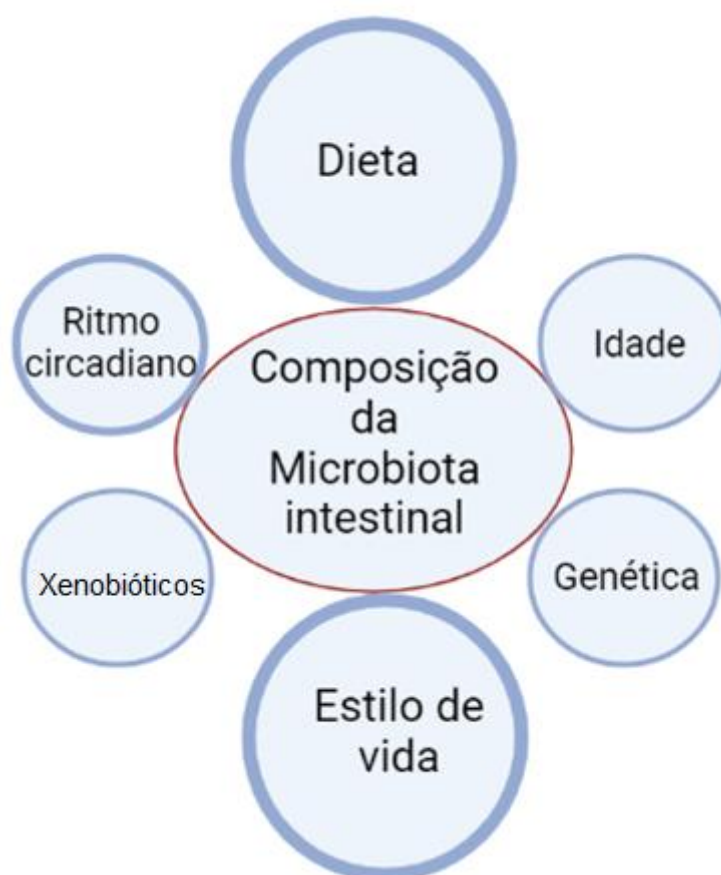
Os microrganismos intestinais são encontrados em maior densidade no ceco e cólon proximal. Enquanto o duodeno e jejuno apresentam baixa concentração de microrganismos em decorrência da liberação de ácidos biliares e suco pancreático que inibem o desenvolvimento de microrganismos (CERDÓ, 2019).

A mucosa intestinal apresenta uma única camada de epitélio separando o lúmen intestinal dos tecidos subjacentes. A porção do epitélio voltada para o lúmen

recebe uma camada de muco, separando tecido epitelial dos microrganismos residentes (SCHEITHAUER, et al. 2020; ZHENG, et al. 2020).

A maioria das espécies presentes na microbiota intestinal são originadas da cavidade bucal ou da alimentação como contaminantes dos alimentos. A composição dos microrganismos intestinais é variável e pode ser influenciada por diversos fatores como hábitos alimentares, consumo de álcool, ingestão de probióticos, ingestão de toxinas, genética, idade, medicamentos, estilo de vida, ritmo circadiano (Figura 5) (CERDÓ, 2019; FERROCINO, et al. 2022; MITEV, TALESKI, 2019; SHANKAR, 2021).

Figura 5: Principais fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal



Fonte: Adaptado de MITEV, TALESKI (2019).

A microbiota intestinal é composta por mais de 300 espécies diferentes de fungos com predominância dos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota. Os gêneros *Candida*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomycetales*, *Fusarium* e *Cryptococcus* são os mais encontrados no intestino humano (FERROCINO, et al. 2022; PÉREZ, 2021).

As espécies de *Candida*, *Saccharomyces* e *Cladosporium* são as principais espécies identificadas na microbiota intestinal. Outras espécies frequentemente encontradas no intestino humano são *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis* (PÉREZ, 2021; ZHANG, et al. 2020).

Crianças apresentam um sistema imune em desenvolvimento e a comunidade bacteriana imatura. Em um estudo realizado por Auchtung e colaboradores (2022), o microbioma intestinal de crianças de 3 meses a 48 meses apresentou uma abundância metagenômica relativa baixa aumentando durante o desmame de leite e da fórmula. A diversidade bacteriana aumentou ao longo do tempo, enquanto a diversidade fúngica permaneceu constante (AUCHTUNG, et al. 2022).

A diversidade e composição fúngica intestinal é influenciada pela ingestão dietética. A escolha adequada de alimentos ajuda a manter o equilíbrio e promover a saúde gastrointestinal. As leveduras são microrganismos mais comuns em produtos alimentares fermentados como pão, cerveja, queijos e outros. A ingestão reduzida de pão e cerveja minimiza a quantidade de *Saccharomyces cerevisiae* nas fezes humanas. Enquanto a presença de *Penicillium* sp. está correlacionada a uma dieta baseada em vegetais e *Candida* sp. em indivíduos com dieta baseada em carnes (SKANKAR, 2021).

2.4.1 Microbiota intestinal e doença

A comunidade microbiana apresenta um ecossistema complexo capaz de responder a perturbações externas como infecções, uso de antimicrobianos e mudanças na dieta. A capacidade de resposta apresenta uma limitação ao estado de equilíbrio entre as comunidades. Ao ultrapassar este estado de equilíbrio ocorre a disbiose (PISANI, et al. 2022; RAO, BHAGATWALA, 2019).

A microbiota intestinal tem papel fundamental na promoção da saúde e doença dos indivíduos. As alterações da microbiota intestinal estão relacionadas a diversas doenças como doença inflamatória intestinal (doença de Crohn e colite ulcerativa), câncer colorretal e distúrbios metabólicos como diabetes, doença hepática gordurosa não alcoólica e obesidade (CHEN, et. al. 2021; YU, et al. 2022).

Na disbiose pode ocorrer um aumento bacteriano no intestino delgado. Diversas bactérias estão associadas a este supercrescimento que pode ocorrer na

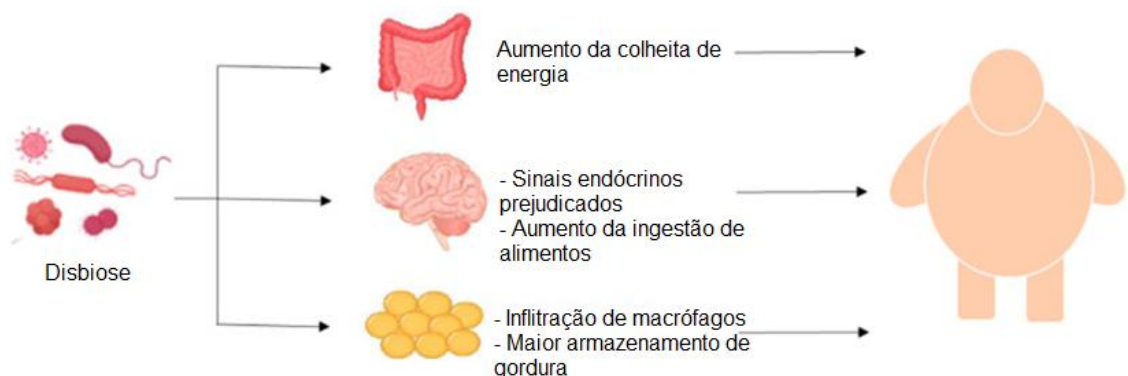
disbiose, destacando-se *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* Diversos sintomas estão associados ao supercrescimento bacteriano tais como inchaço, dor abdominal, gases, náusea, constipação e diarreia. (TAKAKURA, PIMENTEL, 2020).

A disbiose da microbiota intestinal é comum na obesidade e ocorre uma redução da diversidade e da riqueza da microbiota intestinal com redução da abundância de *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii* e Bacteroides e aumento da abundância do Filo Firmicutes (CHEN, et. al. 2021).

A disbiose intestinal pode ser induzida pelo uso de antimicrobianos, promover o ganho de peso, aumento de lipoproteínas de densidade mais baixa e lipoproteína de alta densidade. Além de levar a produção de metabólitos microbianos prejudiciais que aumentam o processo inflamatório associado à obesidade (AOUN, et al. 2020; VETRANI, et al. 2022).

O excesso de armazenamento de gordura é induzido por diversos mecanismos como aumento da captação de energia no intestino, redução da regulação da ingestão alimentar e a inflamação do tecido adiposo (Figura 6) (AOUN, et al. 2020; VETRANI, 2022).

Figura 6: Relação entre a disbiose e a obesidade



Adaptado: VETRANI, 2022.

2.5 OBESIDADE

A obesidade é uma doença crônica e complexa que afeta 650 milhões de adultos, 340 milhões de adolescentes e 39 milhões de crianças em todo o mundo. A

organização mundial da saúde (OMS) estima que até 2025, 167 milhões de adultos e crianças em todo planeta serão classificados como obesos (WHO, 2022).

A obesidade e o sobrepeso são caracterizados pelo acúmulo excessivo ou anormal de gordura resultando no comprometimento dos mecanismos de balanço energético e pode prejudicar a saúde (DHURANDHAR, 2022; WHO, 2021).

O armazenamento excessivo ou anormal de gordura está associado a diversas comorbidades e ao aumento da mortalidade como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doença cardiovascular, doença renal crônica (DRC), esteatose hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), dislipidemia, hipertensão, osteoartrite, depressão, apneia obstrutiva do sono e alguns tipos de câncer (CROVESY, et al. 2020; LIN, LI, 2021).

Além disso, a obesidade é um fator de risco para piora do quadro e prognóstico de infecções como infecções do trato urinário (especialmente em casos pós-traumáticos, adquirida na UTI, gravidez, pós-parto), síndrome respiratória aguda (SARS-CoV-2) e infecções de pele são associadas ao aumento da taxa de mortalidade em indivíduos obesos. Os mecanismos relacionados não são bem definidos, mas acredita-se que incluam alterações do sistema imunológico e deficiência de vitamina D (PUGLIESE, et al. 2022).

A definição da obesidade é feita usando o índice de massa corporal (IMC). O IMC é a razão entre o peso em quilogramas e a altura em metros quadrados (Kg/m^2), adultos com sobrepeso apresentam $\text{IMC} \geq 25$, enquanto adultos obesos apresentam $\text{IMC} \geq 30$. O IMC apresenta a vantagem de ser definido para ambos os sexos e ser uma medida de fácil aplicação populacional para medida da obesidade (ANSARI, 2020; LORENZO, et al., 2019).

A epidemia de obesidade está apoiada em alguns fatores que incluem maior acessibilidade a alimentos ricos em energia, aumento do sedentarismo e alterações da microbiota intestinal envolvida no metabolismo energético. O desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas é a causa central da obesidade. No entanto, o peso corporal é influenciado pelas calorias absorvidas da alimentação e não pelas calorias ingeridas (CUNNINGHAM, 2021).

2.5.1 Obesidade e microbiota intestinal

A composição da microbiota intestinal é menos estável ao longo do tempo quando comparada a microbiota bacteriana. A comunidade microbiana intestinal atua na mediação do efeito do excesso de ingestão alimentar. Na obesidade, as comunidades contribuem com efeitos no sistema imunológico, metabolismo dos nutrientes e hormônios relacionados à ingestão alimentar e controle do apetite (CUNNINGHAM, et al. 2021; YU, et al. 2022; KABWE, et al. 2020).

A microbiota intestinal é capaz de fermentar carboidratos não digeríveis em metabólitos como Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC), síntese de aminoácidos e síntese de algumas vitaminas como biotina e filoquinona. Essas substâncias são fundamentais na regulação do balanço energético, para controlar o apetite e aumentar o gasto energético, prevenindo desta forma, a obesidade e as comorbidades associadas (CHEN, et al. 2021; PISANI, et al. 2022).

A saúde do hospedeiro depende da manutenção da estabilidade da microbiota intestinal. A coabitação do intestino por fungos e bactérias apresenta grande potencial de modulação da saúde metabólica. Indivíduos com obesidade apresentam redução na diversidade e riqueza em populações microbianas quando comparado a microbiota de indivíduos eutróficos. A baixa riqueza da comunidade bacteriana tem sido associada como fator de risco para obesidade e inflamação de baixo grau, enquanto a diversidade microbiana tem sido associada à função metabólica da comunidade microbiana intestinal saudável (CUNNINGHAM, et al. 2021; KIM, et al. 2020; YU, et al. 2022).

A adiposidade e distúrbios metabólicos podem ser associados a abundância relativa de alguns fungos com aumento em pacientes com alterações metabólicas. Os fungos mais abundantes na microbiota intestinal são filo Ascomycota, classes Saccharomycetes, Tremellomycetes e Cystobasidiomycetes, famílias Erythrobasidiaceae e Dipodascaceae e gêneros *Aspergillus*, *Eurotium* e *Rhodotorula*. Além disso, mais recentemente dados do nosso grupo de pesquisa sugerem que na microbiota intestinal de indivíduos obesos, o filo Ascomycota é o mais prevalente sendo *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Fonsecaea* sp. e *Geotrichum silvicola* os mais isolados, seguido dos filios Basidiomycota e Zygomycota (BORGES, et al. 2018; Rodrigues, et al. 2015).

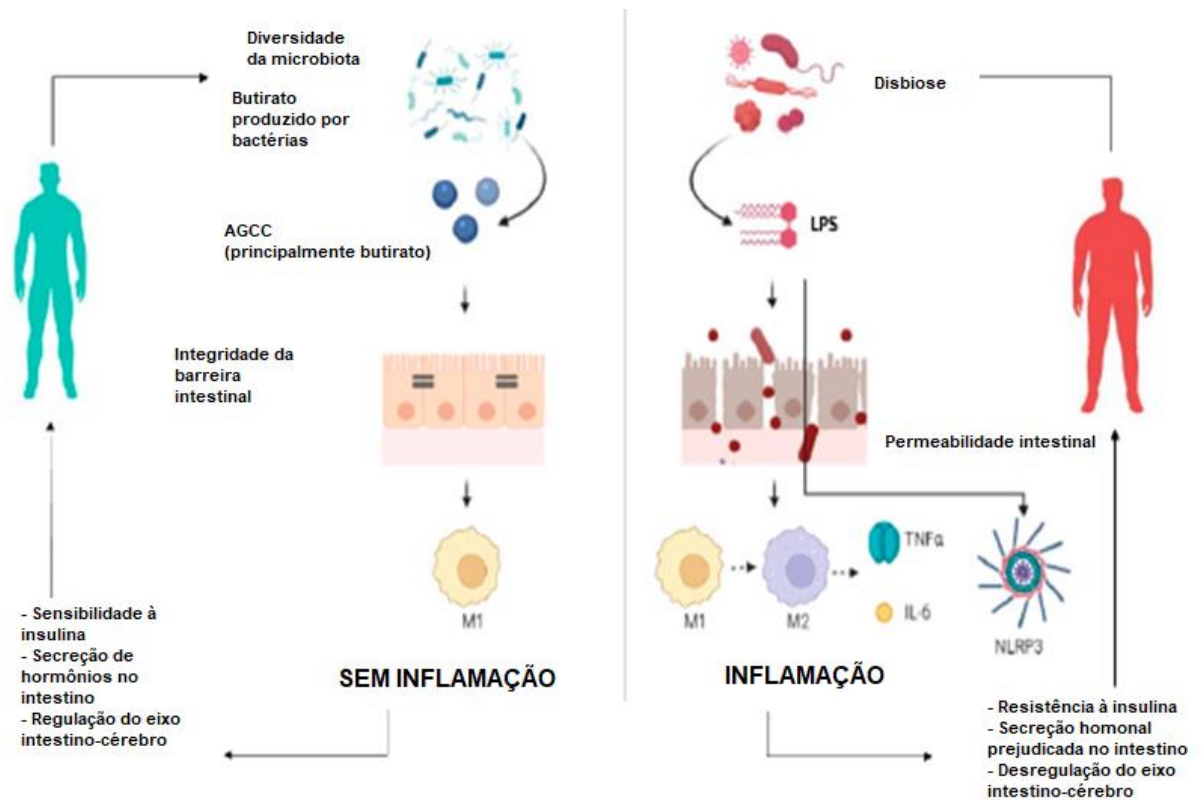
A comunidade microbiana intestinal atua de forma ativa na imunomodulação no intestino e em outros tecidos distantes. As bactérias intestinais modulam a secreção de citocinas inflamatórias, e os altos níveis de interleucina (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF) e proteína C reativa que são biomarcadores inflamatórios e podem estar associados a obesidade (AOUN, *et al.* 2020; REINOLD, 2022).

A microbiota intestinal apresenta tolerância imunológica às constantes modificações de microrganismos inofensivos e preserva a capacidade de resposta imunológica contra infecções de microrganismos patogênicos. Em indivíduos saudáveis, a resposta imune do hospedeiro frente às alterações da microbiota intestinal ocorre na superfície da mucosa (REINOLD, 2022; SCHEITHAUER, 2020; ZHENG, *et al.* 2020).

O desequilíbrio da comunidade microbiana intestinal, também conhecido como disbiose, promove ou permite alterações da composição da comunidade fúngica que por sua vez compromete a barreira da mucosa promovendo distúrbios sistêmicos. Na disbiose, a microbiota intestinal pode ser considerada fornecedora de patógenos oportunistas e promover distúrbios imunológicos em hospedeiros imunocomprometidos. Além disso, a disbiose da microbiota intestinal está associada à obesidade, câncer colorretal e doenças inflamatórias intestinais (DIIs) (GAO, *et al.* 2022; KABWE, *et al.* 2020; SHANKAR, 2021).

A integridade da parede intestinal pode ser alterada em indivíduos com obesidade em decorrência do aumento da atividade de lipopolissacarídeos (LPS) na microbiota intestinal. O LPS é um componente das paredes celulares de bactérias Gram-negativas. A mucosa intestinal torna-se mais fina e permeável em decorrência da difusão passiva de antígenos, levando a inflamação crônica e a redução de células B e secreção de IgA, acarretando no aumento da população microbiana oportunista. A inflamação crônica compromete diversas funções no hospedeiro como sensibilidade à insulina, secreção de hormônios intestinais e regulação do eixo intestino-cérebro (FIGURA 7) (CUNNINGHAM, *et al.* 2021; SCHEITHAUER, 2020; VETRANI, *et al.* 2022; ZATTERALE, *et al.* 2020).

Figura 7: Mecanismos da modulação da inflamação crônica de baixo grau pela microbiota intestinal na obesidade



Adaptado: VETRANI, 2022.

2.6 XENOBIÓTICOS

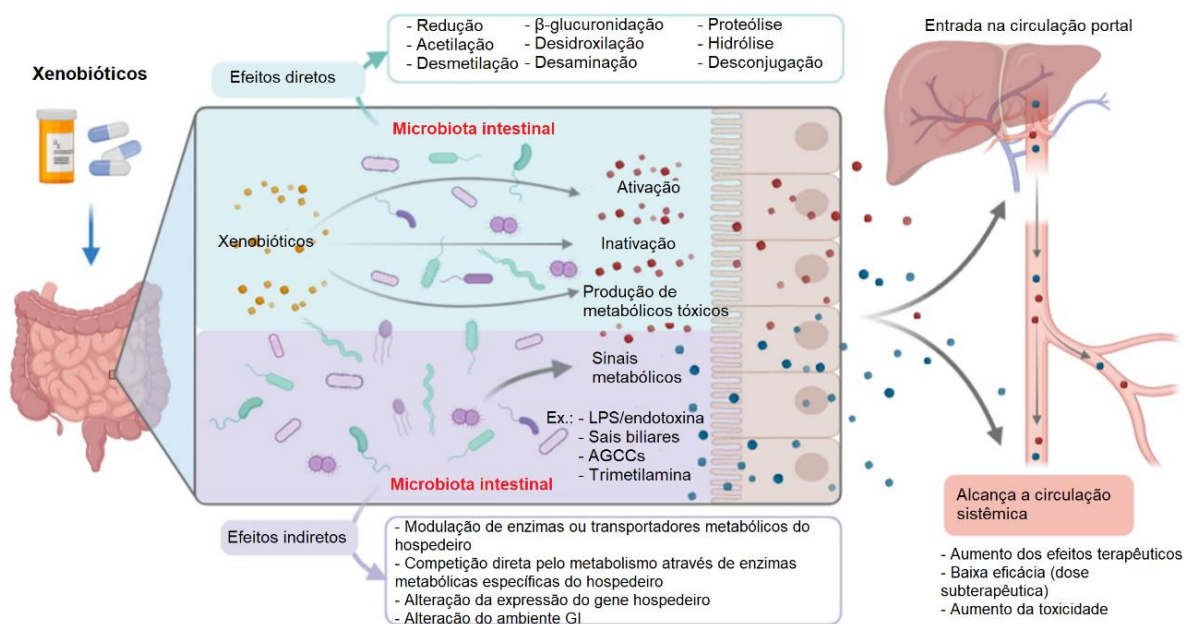
Substâncias estranhas ao organismo humano ou animal e aos sistemas biológicos são conhecidas como xenobióticos. Os xenobióticos podem ser substâncias sintéticas, endobióticas de ocorrência natural (quando presentes em concentrações mais altas que o normal) produzidas por certos organismos (ABDELSALAM, et al. 2020; ORTIZ, et al. 2022).

As substâncias xenobióticas normalmente não estão presentes na constituição de organismos vivos e são utilizadas para finalidades agrícolas, domésticas e industriais. Estão presentes na composição de pesticidas, cosméticos, medicamentos, aromatizantes, fragrâncias, produtos alimentícios, corantes, pigmentos, produtos de higiene pessoal, drogas ilícitas, produtos industriais e resíduos nucleares (ABDELSALAM, et al. 2020; STEFANAC, et al. 2021).

2.6.1 Microbiota intestinal e xenobióticos

A ingestão alimentar dos xenobióticos é uma preocupação para a saúde mundial. No trato gastrointestinal superior (Figura 8), parte dos xenobióticos são absorvidos e translocados para o fígado e sofrem o efeito de primeira passagem (ABDELSALAM, et al. 2020; ORTIZ, et al. 2022).

Figura 8: Influência da ingestão de xenobióticos no trato gastrointestinal humano



Adaptado: DIKEACHA (2022).

Os xenobióticos não metabolizados acumulam no organismo humano e podem desencadear doenças crônicas e inflamatórias. Parte dos xenobióticos não absorvidos vão para o intestino grosso e são expostos à microbiota intestinal. Na microbiota intestinal pode ocorrer a transformação de alguns xenobióticos nocivos em compostos menos tóxicos, o que facilita sua excreção ou alteração da homeostase da composição microbiana levando ao estado de disbiose (DIKEACHA, et al. 2022; ORTIZ, 2022).

Os xenobióticos que alteram a composição da microbiota intestinal são chamados de produtos químicos disruptores da microbiota (QDMs). Os QDMs são associados a doenças intestinais, hormonais e sistêmicas crônicas ou de longo prazo no hospedeiro. Além dos QDMs existem os produtos químicos desreguladores

endócrinos (QDEs) associados a disfunções metabólicas como obesidade e a alteração da microbiota intestinal (AMPATZOGLOU, et al. 2022; GENG, et al. 2022; ORTIZ, et al. 2022).

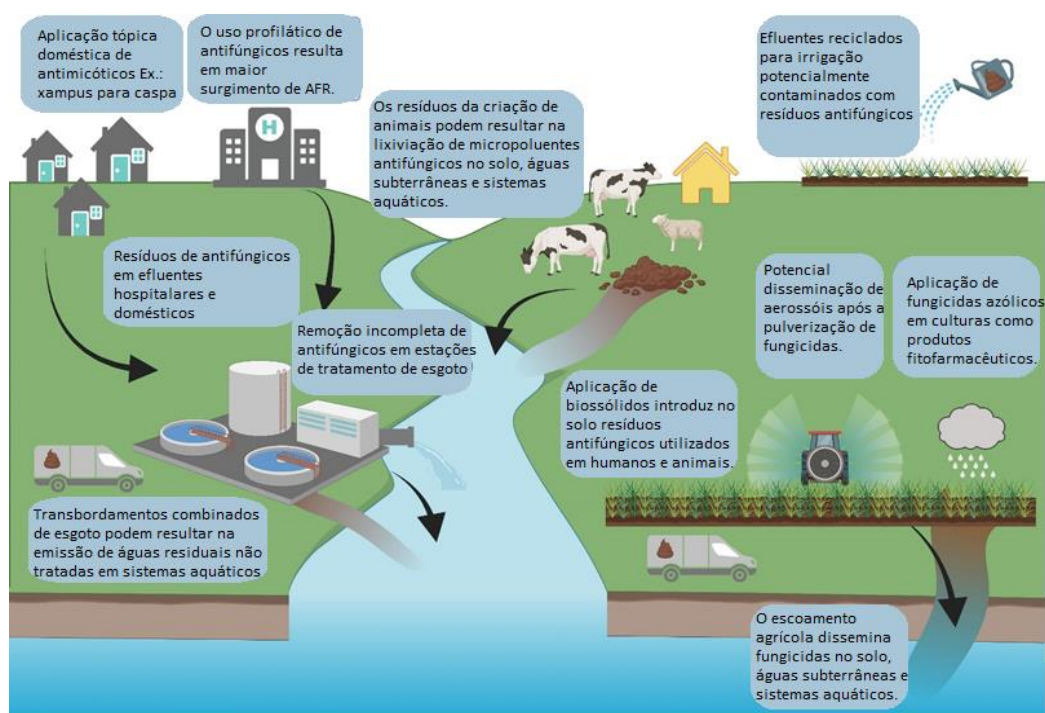
Os QDMs podem interagir com a microbiota intestinal e promover alterações da barreira epitelial com alteração da capacidade de captação ou excreção de QDMs; transformações de metabólitos e mudança de vias metabólicas e expressão alterada de enzimas (AMPATZOGLOU, et al. 2022). Existem diversos QDMs como metais pesados, triclosan e parabenos, éteres difenílicos polibromados, pesticidas como glifosato, clorpirifós, diazinon e drogas antimicrobianos (ORTIZ, et al. 2022).

Os antimicrobianos são os QDMs que apresentam maior potencial de perturbar e alterar a microbiota intestinal e apresentam grande preocupação à saúde humana por contribuírem com a resistência aos antimicrobianos em decorrência do uso de antimicrobianos e pela alteração da microbiota de forma negativa e profunda a curto e longo prazo (AMPATZOGLOU, et al. 2022).

2.6.2 Xenobióticos, meio ambiente e saúde única

O meio ambiente é exposto aos diversos xenobióticos antifúngicos por meio do descarte de resíduos agrícolas, industriais e domésticos, uso de pesticidas na agricultura para combater pragas (Figura 9) (STEVENSON, et al. 2022; WANG, et al. 2022).

Figura 9: Potenciais vias de entrada dos antifúngicos no ambiente



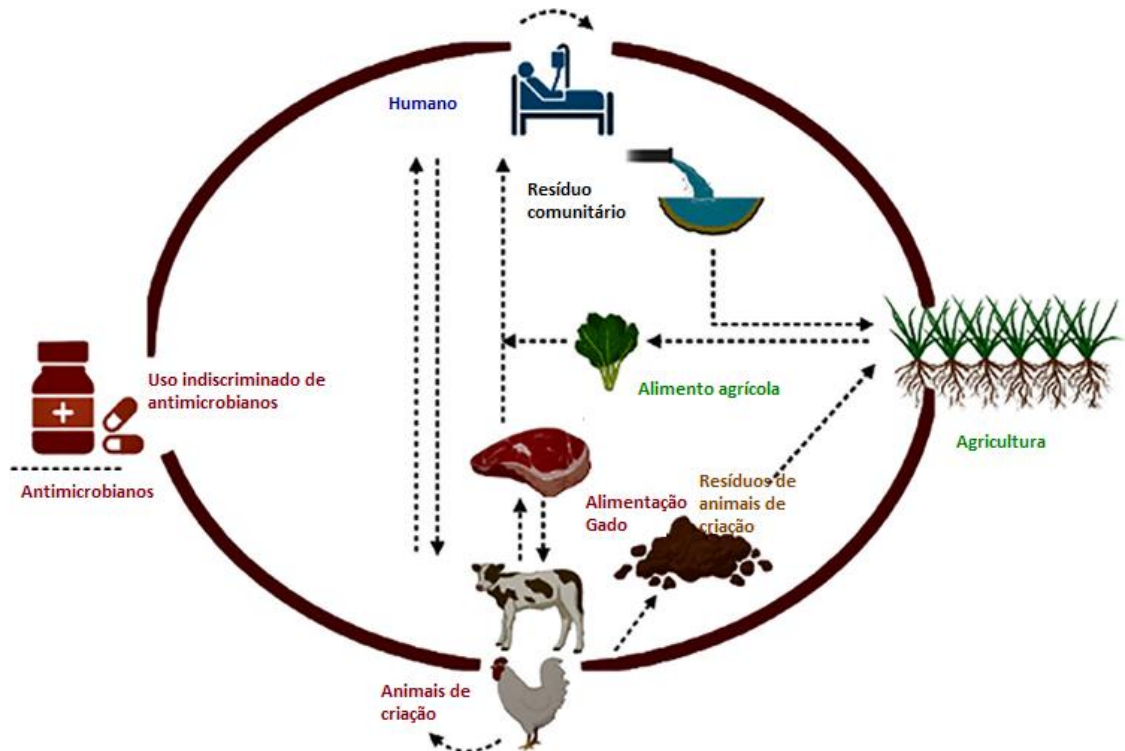
Fonte: STEVENSON (2022).

O tratamento de águas residuais não remove todos os xenobióticos antifúngicos resultando na contaminação de solo, efluentes de águas residuais e águas superficiais receptoras. E ao utilizar as águas residuais recuperadas para irrigação ocorre a contaminação do solo e dos produtos agrícolas com antifúngicos (STEVENSON, et al. 2022).

A utilização de fungicidas de forma direta na agricultura promove o acúmulo e persistência desses xenobióticos por longos períodos de tempo. A pecuária gera resíduos antifúngicos micropoluentes lixiviados no solo, nas águas subterrâneas e nos sistemas aquáticos (FISHER, et al. 2022; STEVENSON, et al. 2022).

As comunidades fúngicas ambiental, humana e animal estão expostas a diversos xenobióticos antimicrobianos o que acarreta o surgimento de reservatórios de resistência. A resistência aos antimicrobianos é reconhecida pelas diretrizes de saúde única como um problema de saúde global que envolve seres humanos, animais e o meio ambiente em decorrência do uso indiscriminado de antimicrobianos para tratamento de infecções, persistência de resíduos antimicrobianos no meio ambiente e pela presença de microrganismos resistentes em todos os nichos humano-animal-ambiental (Figura 10) (ASLAM, et al. 2021).

Figura 10: Potenciais veiculadores de resistência aos antimicrobianos associados as diretrizes de saúde única

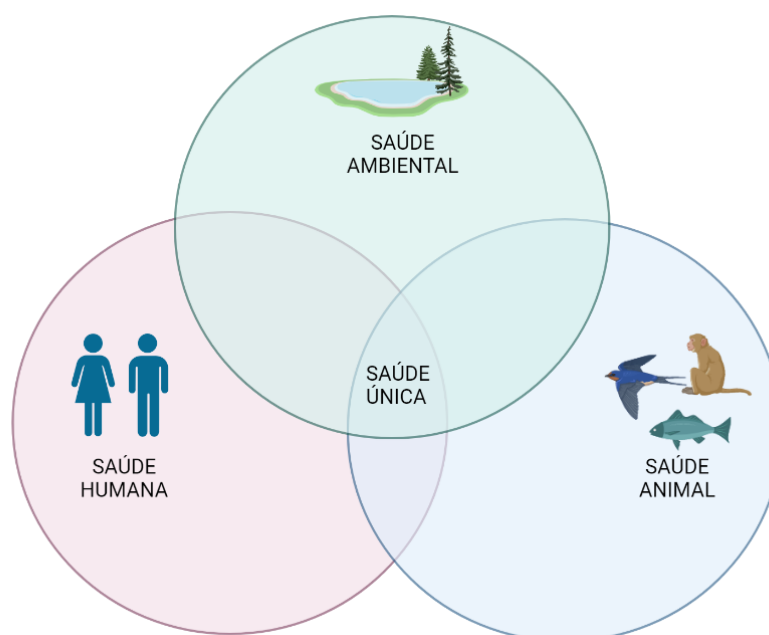


Adaptado: ASLAM (2022).

O conceito saúde única é uma estratégia para promover parcerias e informações multidisciplinares para enfatizar a inter-relação entre humanos, animais, plantas e os ambientes em comum (ASLAM, et al. 2021; BELL, et al. 2018; ORTIZ, et al. 2022).

As políticas de saúde atuais reconhecem a importância da integração da saúde humana, animal e meio ambiente dentro do contexto do ecossistema terrestre visualizando a saúde de um único prisma para alcançar a saúde e bem-estar de todas as comunidades (Figura 11) (ASLAM, et al. 2021; ORTIZ, et al. 2022).

Figura 11: Conceito de saúde única



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A resistência aos antimicrobianos é um problema de saúde global e abordagens interdisciplinares e unificadas baseadas nas diretrizes de saúde única são fundamentais na limitação da disseminação de resistência às drogas. Na estrutura abrangente das diretrizes de saúde única são incorporados seis tópicos prioritários na abordagem de resistência aos antifúngicos: meio ambiente, vigilância, diagnóstico, transmissão, terapêutica e potenciais intervenções (ASLAM, et al. 2021; FISHER, et al. 2022; VERWEIJ, et al. 2020).

O uso generalizado de fungicidas agrícolas de amplo espectro aumenta a cada ano. O tempo de meia vida dos fungicidas azólicos pode variar de 47 dias até 120 dias, considerando seu longo tempo de permanência no ambiente os azóis apresentam grande potencial de gerar resistência ou tolerância fúngica (VERWEIJ, et al. 2020).

Os azóis são fundamentais no tratamento de infecções em animais e em humanos e para tratamento de doenças em plantas. Seu uso na agricultura trouxe benefícios aumentando a segurança alimentar, saúde animal e aumento da qualidade de vida de pacientes com infecções fúngicas (VERWEIJ, et al. 2020).

A pressão seletiva exercida nos fungos ambientais promove a evolução da resistência contra as principais classes de fungicidas como benzimidazóis, inibidores de desmetilação de esteróis (IMDs), estrobilurinas, anilino-pirimidinas e inibidores de succinato desidrogenase e essa resistência ocorre tanto para fungos ambientais como em fungos que causam infecções em humanos (FISHER et al. 2022).

O meio ambiente é frequentemente exposto a diversos poluentes antifúngicos por meio da contaminação de fungicidas agrícolas, efluentes domésticos, hospitalares e industriais que potencialmente podem aumentar o risco de seleção de fungos resistentes. A resistência aos antifúngicos (RAF) é uma ameaça global e emergente à saúde humana. As infecções fúngicas invasivas são amplamente documentadas pelo importante papel na evolução e disseminação da RAF (STEVENSON, et al. 2022).

No entanto, existem poucos estudos que investigam a evolução da resistência aos antifúngicos em ambientes não hospitalares como solo, águas residuais, sistemas aquáticos, na agricultura, pecuária e em seres humanos sem infecções. E não há estudos que envolvam a identificação de resistência aos antifúngicos da microbiota intestinal de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.

A obesidade é caracterizada como uma doença que causa um processo inflamatório de baixo grau associado a disbiose intestinal capaz de alterar a composição e diversidade da comunidade fúngica intestinal. Desta forma, a presença de um ambiente que altere a composição e a diversidade associado a ingestão de alimentos e água expostas a micropoluentes fúngicos poderia gerar um ambiente seletor de espécies fúngicas resistentes.

3.OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

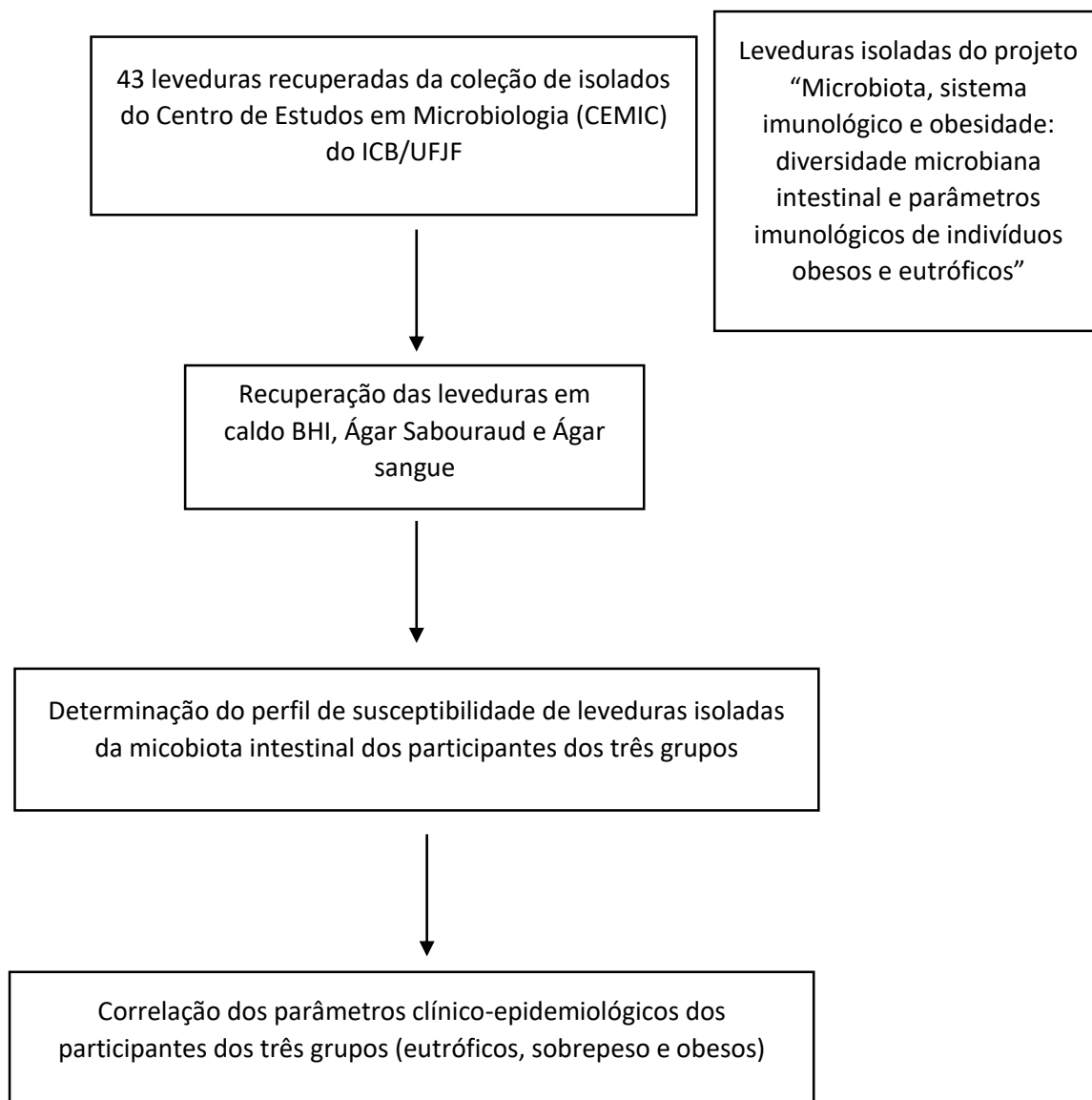
Determinar o perfil de susceptibilidade às drogas antifúngicas de leveduras isoladas da microbiota intestinal de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os indivíduos participantes quanto às suas características antropométricas, nutricionais e laboratoriais;
- Recuperar linhagens de fúngicas leveduriformes isolados da microbiota fecal de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos mantidas na coleção de culturas do Centro de Estudos em Microbiologia do ICB, UFJF;
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de leveduras recuperadas;
- Comparar o perfil de susceptibilidade das leveduras entre os grupos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos;
- Correlacionar o perfil de susceptibilidade com os parâmetros antropométricos, bioquímicos e nutricionais e utilização de xenobióticos dos indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



4.2 COLETA DE DADOS E PREPARO DAS AMOSTRAS

Neste estudo foram recuperadas 43 leveduras isoladas de espécime fecal de 25 voluntários. As leveduras foram adquiridas da coleção de isolados do Centro de Estudos em Microbiologia (CEMIC) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), isoladas do projeto "Microbiota, sistema imunológico e obesidade: diversidade microbiana intestinal e parâmetros imunológicos de indivíduos obesos e eutróficos".

Este estudo é transversal, prospectivo e de caso controle, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Juiz de Fora sob o parecer número 479.002/2013 (Anexo A). Os voluntários foram informados sobre o objetivo do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo B).

Os voluntários foram recrutados em um estudo anterior realizado por Borges e colaboradores (2018) no serviço de nutrição do Hospital HU-Cas/UFJF, na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais. Os critérios de inclusão no estudo foram: idade entre 18 e 60 anos, Índice de Massa Corporal (IMC) superior a 18,5 kg/m², sem uso de antimicrobianos nos 30 dias antecedentes a coleta de espécime fecal, não diabéticos e sem histórico de doenças intestinais.

No serviço de nutrição do HU-Cas/ UFJF os participantes responderam questionários de perfil sociodemográfico, antropométrico, epidemiológico, clínico e frequência alimentar (QFA) e forneceram amostra de espécime fecal coletada em domicílio.

Os dados socioeconômicos coletados são referentes à ocupação profissional, renda familiar, escolaridade, cor, doenças crônicas, utilização de medicamentos e suplementos alimentares. Dados referentes ao estilo de vida como regularidade de atividade física, utilização de cigarro, consumo de bebida alcoólica também foram fornecidos pelos voluntários.

Na avaliação de indicadores antropométricos foram feitas medidas de peso, altura e Índice de Massa Corporal (IMC), circunferência da cintura (CC) e percentual de gordura corporal. De acordo com o IMC os participantes foram divididos em três grupos seguindo os critérios da OMS (1998): Eutróficos (IMC: 18,5-25), sobrepeso (25-30) e obesos (IMC>30).

As amostras fecais foram coletadas e encaminhadas para o Centro de Estudos em Microbiologia (CEMIC), onde foram processadas e isoladas por metodologia adequada para cultivo de leveduras. A identificação das leveduras foi feita por meio de técnicas de Ionização e dessorção a laser assistida por matriz acoplada a analisador do tipo espectro de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS) e as amostras foram armazenadas de forma adequada em caldo BHI com 20% de glicerol em freezer -20°C.

Neste estudo as leveduras do projeto foram recuperadas em meio Caldo BHI, Ágar Sabouraud Dextrose ou Ágar Sangue para posterior determinação do perfil de susceptibilidade às drogas antifúngicas.

4.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ÀS DROGAS ANTIFÚNGICAS

4.3.1 Padronização do experimento

A padronização do método foi realizada de acordo com os parâmetros de controle de qualidade do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), documento M44 (2018) utilizando as linhagens padrão de *Candida* provenientes da ATCC (American Type Culture Collection): *Candida albicans* ATCC 18806 e *Candida tropicalis* ATCC 705 com interpretação dos diâmetros da zona de inibição de acordo com os estabelecidos pelo CLSI (Tabela 2), com definição das categorias sensível, resistente e intermediário.

Tabela 2: Faixas diâmetro da zona de inibição do controle de qualidade com leitura após 24 horas

Agente antifúngico	Concentração do disco (µg)	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Caspofungina	5	18-27	20-27
Fluconazol	25	28-39	26-37
Voriconazol	1	31-42	-

Fonte: CLSI (2018).

4.3.2 Preparação do inóculo

A preparação do inóculo foi realizada de acordo com o documento M44 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2018. Inicialmente as leveduras foram recuperadas em Caldo BHI ou Ágar sangue e incubados em Ágar Sabouraud Dextrose na temperatura de 35°C por 24 horas. Na preparação do inóculo, algumas colônias foram selecionadas e inoculadas em 5 mL de salina estéril (NaCl à 0,9%) e

ressuspensas com o auxílio de vórtex por 15 segundos com a turbidez ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland.

4.3.3 Inoculação na placa

Nesta etapa do estudo foram utilizadas placas de Ágar Mueller Hinton (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) suplementado com 2% de glicose e 0,5 µg/mL de corante azul de metileno com ajuste de pH entre 7,2 a 7,4. Com auxílio de um swab o inóculo foi semeado por toda a superfície do ágar de forma uniforme. Após a inoculação foram aguardados de 3 a 5 minutos para a secagem da placa. A inoculação em Ágar Mueller Hinton foi realizada segundo o documento M44 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2018. Foram realizadas triplicatas para cada isolado.

4.3.4 Aplicação de discos na superfície do ágar inoculado

Os discos de drogas antifúngicos utilizados nos ensaios foram os derivados azólicos de primeira geração itraconazol 10 µg (Liofilchem, Teramo, Itália) e fluconazol 25 µg (Cecon, São Paulo, Brasil); e o derivado azólico de segunda geração voriconazol 1 µg (Liofilchem, Teramo, Itália); anfotericina B 100 µg (Liofilchem, Teramo, Itália) representando a classe dos polienos e a caspofungina 5 µg (Liofilchem, Teramo, Itália) como representante da classe das equinocandinas.

As drogas foram distribuídas respeitando a distância de 24 mm entre cada disco. As placas inoculadas foram invertidas e incubadas a 35°C por 48 horas com posterior interpretação das zonas de inibição. A distribuição dos discos foi realizada de acordo com as orientações do documento M44 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2018.

4.3.5 Interpretação das zonas de inibição

A interpretação das zonas de inibição das leveduras *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* foi realizada de acordo com a referência descrita no

documento M60 (CLSI, 2017) para as drogas fluconazol, voriconazol e caspofungina. Para as drogas anfotericina B e itraconazol foram seguidos os critérios de interpretação dos fabricantes Liofilchem (2021) e Cecon (2014) para estas leveduras.

Na interpretação das zonas de inibição das leveduras *C. intermedia* e *C. pararugosa* foram seguidos os critérios do fabricante Cecon (2014) que considera a mesma interpretação das zonas de inibição para todas as espécies de *Candida* sp.

Para demais espécies de leveduras não existem critérios de interpretação no documento M60 e nas bulas dos fabricantes Liofilchem (2021) e Cecon (2014) para interpretação de perfil de susceptibilidade para métodos de disco difusão. No entanto, foram considerados critérios como a proximidade filogenética e a utilização de referências bibliográficas de interpretação de halos por outros estudos.

Na interpretação dos halos de inibição das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* foi considerada a proximidade filogenética. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta proximidade filogenética a *C. glabrata* e as leveduras *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* apresentam proximidade filogenética com *C. parapsilosis*. Sendo então consideradas as zonas de inibição utilizadas para interpretar o perfil de susceptibilidade das leveduras descritas no documento M60 (CLSI, 2017) (MANSERA, et al. 2019; THOMAS, et al. 2018 WHALEY, et al. 2016).

As espécies de *Rhodotorula mucilaginosa* tiveram a interpretação das zonas de inibição de acordo com Seifi e colaboradores (2013). As buscas nas bases de dados de artigos científicos demonstram escassez para dados de referência de zonas de inibição de halos para as leveduras *Pichia manshurica* e *Exophiala* sp. sendo necessário a realização de média de halos considerando as demais leveduras com halos de inibição definidos pelo documento M60 (CLSI, 2017) e das bulas dos fabricantes.

As interpretações das zonas de inibição dos halos para as drogas foram descritas nas tabelas: anfotericina B (Tabela 3), fluconazol (Tabela 4), voriconazol (Tabela 5), itraconazol (Tabela 6), caspofungina (Tabela 7).

Tabela 3: Interpretação da zona de inibição dos halos para a droga anfotericina B

Leveduras	S	I	SSD	R	Referência
<i>C. albicans</i>	>10	-	-	≤10	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021;
<i>C. glabrata</i>	>10	-	-	≤10	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021;
<i>C. intermedia</i>	>10	-	-	≤10	Cecon, 2014.
<i>C. krusei</i>	>27	-	-	<18	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021;
<i>C. metapsilosis</i>	>10	-	-	≤10	THOMAZ, et al. 2018.
<i>C. orthopsilosis</i>	>10	-	-	≤10	THOMAZ, et al. 2018.
<i>C. parapsilosis</i>	>10	-	-	≤10	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021.
<i>C. pararugosa</i>	>10	-	-	≤10	Cecon, 2014.
<i>Exophiala sp.</i>	>10	-	-	≤10	-
<i>P. manshurica</i>	>10	-	-	≤10	-
<i>R. mucilaginosa</i>	≥15	-	10-14	≤9	SEIFI, et al. 2013
<i>S. cerevisiae</i>	>10	-	-	≤10	CARRETÉ, et al. 2018.

S: sensível, I: intermediário, SSD: sensível dependente de dose, R: resistente.

Tabela 4: Interpretação da zona de inibição dos halos para a droga Fluconazol

Leveduras	S	I	SSD	R	Referência
<i>C. albicans</i>	>17	-	14-16	<13	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021; M60 CLSI, 2017.
<i>C. glabrata</i>	RI	RI	RI	RI	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021; M60 CLSI, 2017.
<i>C. intermedia</i>	≥19	-	-	≤14	Cecon, 2014.
<i>C. krusei</i>	RI	RI	RI	RI	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021; M60 CLSI, 2017.
<i>C. metapsilosis</i>	>17	-	14-16	<13	THOMAZ, et al. 2018.
<i>C. orthopsilosis</i>	>17	-	14-16	<13	THOMAZ, et al. 2018.
<i>C. parapsilosis</i>	>17	-	14-16	<13	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021; M60 CLSI, 2017.
<i>C. pararugosa</i>	>22	-	-	<14	Cecon, 2014.
<i>Exophiala sp.</i>	>22	-	-	<14	Média de halos.
<i>P. manshurica</i>	>22	-	-	<14	Média de halos.
<i>R. mucilaginosa</i>	>19	-	15-18	<14	SEIFI, et al. 2013.
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	CARRETÉ, et al. 2018.

S: sensível, I: intermediário, SSD: sensível dependente de dose, R: resistente.

Tabela 5: Interpretação da zona de inibição dos halos para a droga Voriconazol

Leveduras	S	I	SSD	R	Referência
<i>C. albicans</i>	>17	15-16	-	>14	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021; M60 CLSI, 2017.
<i>C. glabrata</i>	≥17	-	14-16	≤13	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021; M60 CLSI, 2017.
<i>C. intermedia</i>	>17	-	-	<14	Cecon, 2014.
<i>C. krusei</i>	>15	13-14	-	>12	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021; M60 CLSI, 2017.
<i>C. metapsilosis</i>	>17	15-16	-	<14	THOMAZ, et al. 2018
<i>C. orthopsilosis</i>	>17	15-16	-	<14	THOMAZ, et al. 2018.
<i>C. parapsilosis</i>	>17	15-16	-	<14	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021; M60 CLSI, 2017.
<i>C. pararugosa</i>	>17	-	-	<14	Cecon, 2014.
<i>Exophiala sp.</i>	>17	-	-	<14	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021.
<i>P. manshurica</i>	>17	-	-	<14	Média de halos.
<i>R. mucilaginosa</i>	>17	-	-	<14	SEIFI, et al. 2013.
<i>S. cerevisiae</i>	>17	-	14-16	<14	CARRETÉ, et al. 2018.

S: sensível, I: intermediário, SSD: sensível dependente de dose, R: resistente.

Tabela 6: Interpretação da zona de inibição dos halos para a droga Itraconazol

Leveduras	S	I	SSD	R	Referência
<i>C. albicans</i>	>20	12-19	-	<12	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021; M60 CLSI, 2017.
<i>C. glabrata</i>	>20	12-19	-	<12	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021; M60 CLSI, 2017.
<i>C. intermedia</i>	>20	12-19	-	<12	Cecon, 2014.
<i>C. krusei</i>	>26	-	-	<18	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021; M60 CLSI, 2017.
<i>C. metapsilosis</i>	>20	12-19	-	<12	THOMAZ, et al. 2018.
<i>C. orthopsilosis</i>	>20	12-19	-	<12	THOMAZ, et al. 2018
<i>C. parapsilosis</i>	>20	12-19	-	<12	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021; M60 CLSI, 2017.
<i>C. pararugosa</i>	>26	-	-	<18	Cecon, 2014.
<i>Exophiala sp.</i>	>26	-	-	<18	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021.
<i>P. manshurica</i>	>26	-	-	<18	Média de halos.
<i>R. mucilaginosa</i>	>26	-	-	<18	SEIFI, et al. 2013
<i>S. cerevisiae</i>	>20	12-19	-	<12	CARRETÉ, et al. 2018

S: sensível, I: intermediário, SSD: sensível dependente de dose, R: resistente.

Tabela 7: Interpretação da zona de inibição dos halos para a droga Caspofungina

Leveduras	S	I	SSD	R	Referência
<i>C. albicans</i>	>17	15-16	-	<14	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021; M60 CLSI, 2017
<i>C. glabrata</i>	≥17	-	-	≤14	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021; M60 CLSI, 2017
<i>C. intermedia</i>	>17	-	-	<14	Cecon, 2014
<i>C. krusei</i>	>17	15-16	-	<14	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021; M60 CLSI, 2017.
<i>C. metapsilosis</i>	>13	11-12	-	<10	THOMAZ, et al. 2018
<i>C. orthopsilosis</i>	>13	11-12	-	<10	THOMAZ, et al. 2018.
<i>C. parapsilosis</i>	>13	11-12	-	<10	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021; M60 CLSI, 2017.
<i>C. pararugosa</i>	>17	-	-	<14	Cecon, 2014.
<i>Exophiala sp.</i>	>17	-	-	<14	Cecon, 2014; Liofilchem, 2021.
<i>P. manshurica</i>	>17	-	-	<14	Média de halos
<i>R. mucilaginosa</i>	>17	-	-	<14	SEIFI, et al. 2013
<i>S. cerevisiae</i>	≥17	-	-	≤14	CARRETÉ, et al. 2018.

S: sensível, I: intermediário, SSD: sensível dependente de dose, R: resistente.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos resultados quantitativos foram utilizadas as ferramentas estatísticas PAST 3.0 e GraphPad Prism 9.4.1. Os dados obtidos foram avaliados quanto à distribuição pelos testes de Shapiro-Wilk. Para os dados que apresentaram distribuição normal foi realizado a correlação de Pearson, teste ANOVA two-way e para as correlações múltiplas foi realizado o teste de Tukey, análise do componente principal (PCA) e índice MAR. Na correlação de Pearson o coeficiente de correlação varia de -1 a +1, a correlação é considerada forte quando o valor de r for mais próximo de 1. O teste foi realizado para analisar diferenças de variáveis discretas. Os achados foram considerados significativos em $p < 0,05$. O cálculo de índice de multiresistência às drogas (índice MAR) foi realizado para determinar a prevalência de espécies multiresistentes dentre os isolados avaliados.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS, NUTRICIONAIS E LABORATORIAIS DOS PARTICIPANTES

As leveduras que obtiveram o perfil de susceptibilidade avaliado foram isoladas de 25 voluntários. A média de idade dos participantes foi de 37,8 e 72% dos participantes pertenciam ao sexo feminino. Os participantes foram avaliados quanto às características antropométricas de IMC e medidas de circunferência abdominal, cintura, quadril, relação cintura quadril e classificados nos três grupos: eutróficos, sobrepeso e obesos.

As características antropométricas demonstram um aumento gradual nas medidas de circunferência abdominal, cintura, quadril, relação cintura quadril e IMC sendo a menor medida identificada no grupo eutrófico e a maior medida no grupo obeso (Tabela 8).

Tabela 8: Características antropométricas dos voluntários do estudo

Parâmetros	Grupo de indivíduos			
	Eutrófico (n=6)	Sobrepeso (n=9)	Obeso (n= 10)	
Sexo (masculino/feminino)	2/4	5/4	1/9	
Média idade (anos \pm DP)	36,2 \pm 10,1	35,0 \pm 14	41,2 \pm 12,1	
Média IMC (média \pm DP)	22,9 \pm 1,71	26,6 \pm 1,31	40 \pm 5,27	
Circunferência abdominal (média \pm DP)	Masculino	95,0 \pm NA	96,7 \pm 3,83	111,22 \pm 16,63
	Feminino	86,1 \pm 3,94	94,2 \pm 8,53	122,0 \pm 12,5
Circunferência cintura (média \pm DP)	Masculino	92,00 \pm NA	91,5 \pm 5,68	110,66 \pm 17,38
	Feminino	77,7 \pm 5,09	86,3 \pm 5,43	116,0 \pm 14,3
Circunferência quadril (média \pm DP)	Masculino	100,00 \pm NA	107,0 \pm 4,60	110,77 \pm 4,32
	Feminino	100 \pm 5,13	108,0 \pm 7,38	1129 \pm 10,0
Razão cintura/quadril (média \pm DP)	Masculino	0,93 \pm 0,NA	0,85 \pm 0,72	1,00 \pm 0,16
	Feminino	0,61 \pm 0,34	0,80 \pm 0,03	0,89 \pm 0,07

Os parâmetros laboratoriais avaliados sugerem diferença estatística significativa entre os parâmetros de HDL e insulina basal mesmo com resultados dentro dos valores de referência. O grupo eutrófico apresentou maiores concentrações de HDL que o grupo obeso. A insulina basal no grupo sobrepeso apresentou maiores concentrações (Tabela 9).

Tabela 9: Dados laboratoriais dos voluntários do estudo

Parâmetros	Grupos			p^a	p^b	p^b	p^b
	Eutrófico (Eu)	Sobrepeso (Sb)	Obeso (Ob)				
Glicose sérica (mg/dL)	85,67±10,15	87,78±6,53	92,60±22,03	0,687	0,916	0,735	0,891
Insulina Basal (mcUI/mL)	5,42±1,39	9,12±2,17	12,99±10,83	0,392	0,031*	0,074	0,915
HOMA-IR	1,32±0,42	1,99±0,51	2,85±2,02	0,099	0,189	0,184	0,426
HOMA-β	155,7±149,0	141,8±51,77	164,7±150,7	0,923	0,976	0,999	0,959
Triglicérides (mg/dl)	97,17±52,30	106±40,01	118,6±44,04	0,636	0,665	0,832	0,919
Colesterol total (mg/dL)	198,30±43,16	172±29,80	196,0±51,92	0,392	0,470	0,859	0,886
Colesterol LDL (mg/dL)	116,60±23,76	98,33±27,96	128,3±44,64	0,198	0,439	0,997	0,680
Colesterol HDL (mg/dL)	62,67±11,96	52,89±15,96	44,40±7,56	0,027*	0,519	0,018*	0,261
Colesterol VLDL (mg/dL)	22,45±10,51	21,20±8,01	23,72±8,81	0,830	0,873	0,991	0,919
Creatinina Sérica (mg/dl)	0,94±0,13	0,95±0,16	0,92±0,16	0,919	0,991	0,909	0,825
Cortisol Basal (mcg/dL)	15,22±4,66	12,71±5,31	9,97±2,34	0,065	0,787	0,141	0,360
Hemoglobina (g/dL)	13,55±0,81	14,64±1,34	13,69±1,14	0,133	0,144	0,974	0,467

Teste de normalidade Shapiro-Wilk, ^aValores de p para o teste ANOVA two-way ^b valores de p para teste de comparações múltiplas de Tukey.

Nas características nutricionais foi determinado o percentual de ingestão dos macronutrientes pelos voluntários (carboidratos, proteínas, lipídios e fibras) e o consumo de alimentos *in natura*, minimamente processados, processados e ultraprocessados.

Os alimentos foram distribuídos de acordo com o grau de processamento é dividido em três grupos seguindo os critérios de Monteiro e colaboradores (2012). No grupo 1 estão os alimentos *in natura* e os alimentos minimamente processados. Os alimentos *in natura* são os alimentos de origem vegetal e animal logo após a colheita ou o abate. Os alimentos minimamente processados são alimentos *in natura* sem adição de ingredientes que passaram por algum processo mecânico como limpeza, moagem, pasteurização, refrigeração ou congelamento.

Os ingredientes culinários processados estão incluídos no grupo 2, estes produtos são produzidos a partir de alimentos *in natura* mas passam por processos como prensagem, moagem, trituração, refino e adição de aditivos químicos. São exemplos de alimentos pertencentes ao grupo 2 óleos vegetais, açúcares, farinhas e sal (MONTEIRO, et al. 2012).

Os alimentos processados e ultraprocessados estão no grupo 3. Neste grupo, os alimentos pertencem inicialmente ao grupo 1 e ao grupo 2 passam por vários processos de conserva, adição de óleo, açúcares ou sal e tornam-se alimentos processados. Os alimentos ultraprocessados apresentam conservantes, estabilizantes, emulsificantes, solventes, adoçantes, realçadores de sabor, corantes. Normalmente com grande densidade energética e baixa concentração de fibras (MONTEIRO, et al. 2012).

Na análise de macronutrientes não foram observadas diferenças significativas do consumo diário entre os indivíduos dos três grupos avaliados (Tabela 10). A média de consumo diário de macronutrientes está dentro da AMDR (*acceptable macronutrient distribution range*) representando uma ingestão adequada de macronutrientes essenciais adequadas para os grupos amostrais.

Tabela 10: Média dos macronutrientes ingeridos pelos participantes do estudo. Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$)

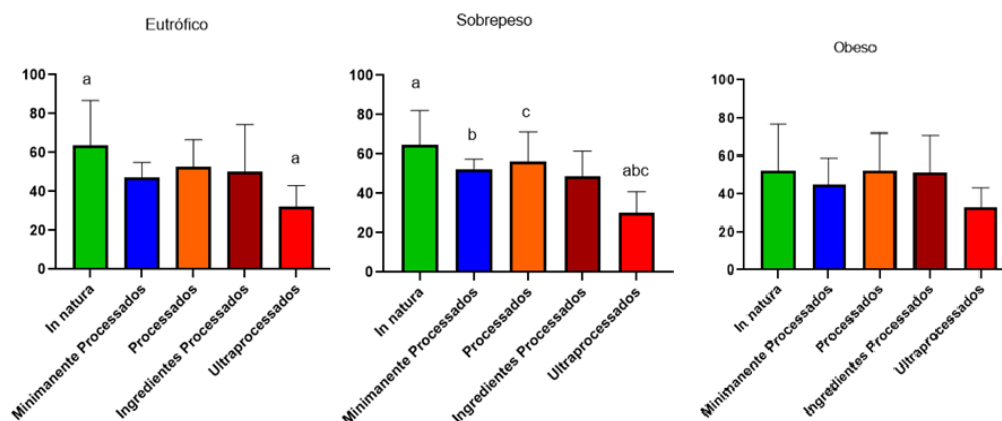
Macronutriente	Eutrófico (Eu)	Sobrepeso (Sb)	Obeso (Ob)	p^a	p^b (Eu x So)	p^b (Eu x Ob)	p^b (Sb x Ob)
Carboidratos (%)	50,94±8,71	55,79±8,91	56,4±7,59	0,430	0,523	0,435	0,988
Proteínas (%)	18,79±3,97	19,47±3,29	17,96±3,76	0,668	0,932	0,899	0,643
Lipídeos (%)	32,35±3,79	31,24±7,18	29,10±5,96	0,553	0,936	0,560	0,7255
Fibras (g)	20,37±14,44	24,92±6,06	28,62±12,47	0,372	0,722	0,342	0,753

Teste de normalidade Shapiro-Wilk, ^aValores de p para o teste ANOVA two-way ^b valores de p para teste de comparações múltiplas de Tukey.

Foi avaliado o consumo de alimentos ultraprocessados, ingredientes culinários processados, processados, minimamente processados e *in natura*. As correlações entre consumo de cada grupo alimentar (*in natura*, minimamente processados, ingredientes culinários, processados e ultraprocessados) e os grupos eutróficos, sobrepeso e obeso não apresentaram resultados estatisticamente significativos no teste ANOVA two-way com $p > 0,05$ (Figura 12).

No entanto, houve diferença estatística significativa ao comparar o grau de processamento dos alimentos dentro do grupo (eutrófico, sobrepeso ou obeso). No grupo eutrófico ocorreu maior consumo de alimentos *in natura* e quando comparado ao consumo de alimentos ultraprocessados. No grupo sobrepeso, o consumo dos alimentos ultraprocessados foi maior do que o consumo de alimentos *in natura*, alimentos minimamente processados e processados. Não houve diferença significativa entre os grupos alimentares para o grupo obeso (Figura 12).

Figura 12: Correlação entre a média de consumo de alimentos de acordo com o grau de processamento. Letras diferentes acima das barras de erro indicam resultados com diferença estatística ($p < 0,05$), de acordo com o teste ANOVA two-way



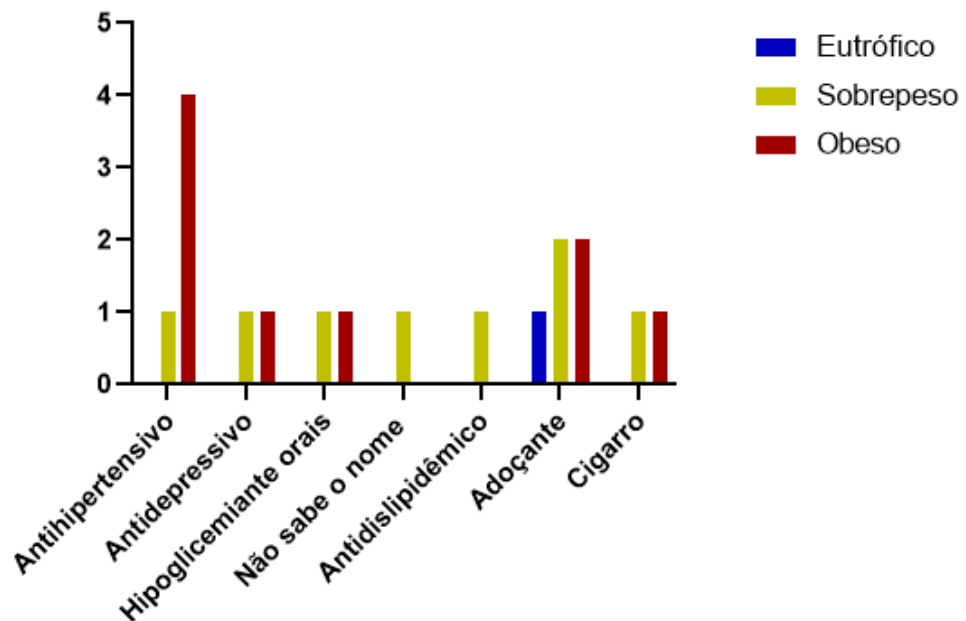
5.2 UTILIZAÇÃO DE XENOBIÓTICOS PELOS PARTICIPANTES

O uso de xenobióticos pelos participantes foi avaliado considerando a utilização de medicamentos, adoçantes e a utilização de cigarros. Os participantes relataram a utilização diária de diversos medicamentos como anti-hipertensivos, antidepressivos, hipoglicemiantes orais, antilipídicos e utilização de medicamentos aos quais não se sabe o nome comercial ou a finalidade de utilização do medicamento. O grupo

obeso foi o grupo com maior número de participantes relatando a utilização de anti-hipertensivos. Tanto o grupo dos obesos quanto o grupo sobrepeso apresentou utilização de antidepressivos, hipoglicemiantes orais e medicação para tratamento de dislipidemia. Os voluntários do grupo dos eutróficos não reportaram a utilização de medicação.

Os adoçantes artificiais utilizados foram sucralose e acessulfame K e sacarina e ciclamato sendo a utilização associada a 5 voluntários (1 voluntário eutrófico, 2 voluntários com sobrepeso e 2 voluntários obesos). A utilização de cigarros foi relatada por um voluntário com sobrepeso e um voluntário do grupo obeso (Figura 13).

Figura 13: Distribuição de xenobióticos (medicamentos, cigarros e adoçante utilizado pelos participantes distribuídos por grupos (eutrófico, sobrepeso e obeso)



5.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DAS LEVEDURAS ISOLADAS DA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

Dos 43 isolados de leveduras recuperadas, 25 leveduras (58,14%) pertencem ao gênero *Candida* spp. 7 leveduras da espécie *Rhodotorula mucilaginosa* (16,28%), 4 leveduras do gênero *Exophiala* spp. (9,30%), 6 leveduras são da espécie

Saccharomyces cerevisiae (13,95%) e 1 levedura da espécie *Pichia manshurica* (2,33%).

Das leveduras do gênero *Candida* spp. isoladas, 4 leveduras são da espécie *C. albicans* (9,30%); 1 levedura da espécie *C. glabrata* (2,32%), 1 levedura da espécie *C. intermedia* (2,32%), 1 levedura da espécie *C. krusei* (2,32%), 17 leveduras do complexo *C. parapsilosis* (39,53%) com 15 leveduras da espécie *C. parapsilosis sensu stricto*, 1 levedura *C. metapsilosis* e 1 levedura *C. orthopsilosis*.

Da totalidade de isolados, 9 leveduras foram isoladas de 4 voluntários eutróficos, 15 leveduras isoladas de 9 voluntários com sobrepeso e 19 leveduras foram isoladas de 10 voluntários do grupo dos obesos (Tabela 11).

Tabela 11: Número e prevalência (%) das linhagens de leveduras recuperadas da coleção de isolados do Centro de Estudos em Microbiologia distribuídas por grupo (eutrófico, sobrepeso e obeso)

Levedura (n)	Grupos			
	N (%)	Eutrófico n (%)	Sobrepeso n (%)	Obeso n (%)
Total de isolados	43	9	15	19
<i>C. albicans</i>	4 (9,30)	2(50,00)	2(50,00)	-
<i>C. glabrata</i>	1 (2,32)	-	-	1(100)
<i>C. intermedia</i>	1 (2,32)	-	1(100)	-
<i>C. krusei</i>	1 (2,32)	-	-	1(100)
Complexo <i>C. parapsilosis</i>	17 (39,54)	2(11,76)	5(29,41)	10(58,83)
<i>C. pararugosa</i>	1 (2,32)	1(100)	-	-
<i>Exophiala</i> sp.	4 (9,30)	-	1(25,00)	3(75,00)
<i>P. manshurica</i>	1 (2,32)	1(100)	-	-
<i>R. mucilaginosa</i>	7 (16,29)	1(14,30)	3(42,85)	3(42,85)
<i>S. cerevisiae</i>	6 (13,96)	2(33,33)	3(50)	1(16,67)

No teste de susceptibilidade às drogas antifúngicas foi realizado o teste qui quadrado que revelou diferença estatística significativa no perfil de susceptibilidade para as leveduras isoladas da microbiota intestinal frente às diferentes drogas utilizadas quando avaliados os resultados de todos os isolados (Figura 14). Dos 43 isolados, 81,39% apresentaram resistência ao itraconazol, 67,44% de resistência a caspofungina, 39,53% apresentaram resistência ao fluconazol, 32,55% resistentes ao voriconazol e não houve resistência à anfotericina B (Tabela 12).

O grupo obeso apresentou maior número de isolados resistentes a caspofungina e ao itraconazol. 15 isolados apresentaram resistência a caspofungina (78,9%) e 15 isolados foram resistentes ao itraconazol (78,9%). Os grupos eutrófico e sobrepeso apresentaram maior resistência ao itraconazol, o grupo dos eutróficos apresentou 8 isolados resistentes (88,9%) e o grupo sobrepeso apresentou 12 isolados com resistência ao itraconazol (80%) (tabela 12).

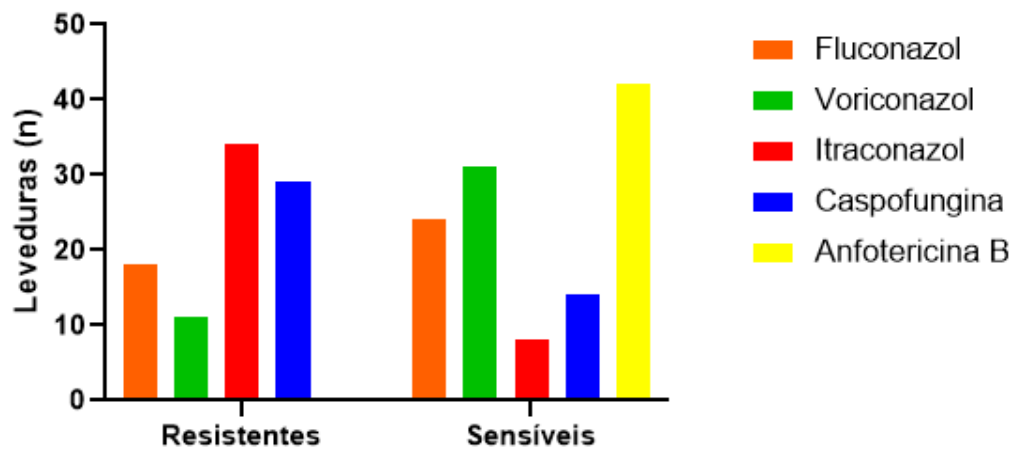
A caspofungina foi a segunda droga para a qual as leveduras apresentaram maior resistência entre os grupos com 10 isolados resistentes (66,7%) no grupo sobrepeso e 15 isolados resistentes (78,9%) no grupo obeso. 4 leveduras (44,4%) isoladas do grupo eutrófico apresentaram resistência à caspofungina.

Tabela 12: Percentual de resistência das leveduras isoladas da microbiota intestinal distribuído por grupo

Droga	Número total de isolados resistentes n (%)*	Número de isolados resistentes n (%)		
		Eutrófico	Sobrepeso	Obeso
Total de isolados	43	9	15	19
Anfotericina B	0	0	0	0
Fluconazol	17 (39,53)	5 (55,55)	5 (33,33)	9 (47,36)
Voriconazol	14 (32,55)	4 (44,44)	3 (20,00)	4 (21,00)
Itraconazol	35 (81,39)	8 (88,88)	12 (80,00)	15 (78,94)
Caspofungina	29 (67,44)	4 (44,44)	10 (66,66)	15 (78,94)

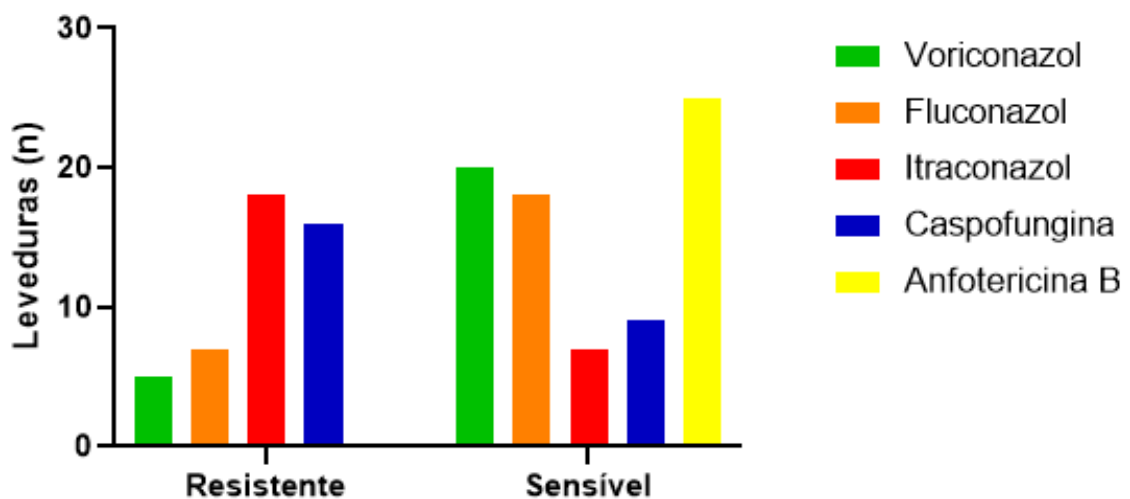
* Teste qui-quadrado p-valor <0,001.

Figura 14: Comparação entre os perfis de resistência e sensibilidade de todas as leveduras. Resultados com diferença estatística ($p < 0,05$), de acordo com o teste qui-quadrado



Observou-se diferença significativa entre os perfis de susceptibilidade às drogas ($p < 0,05$), de acordo com o teste qui-quadrado. Nas leveduras do gênero *Candida* isoladas (Figura 15) ocorreu um padrão de susceptibilidade semelhante da análise geral das leveduras (Figura 14), com a ocorrência de maior número de isolados resistentes ao itraconazol seguido da caspofungina.

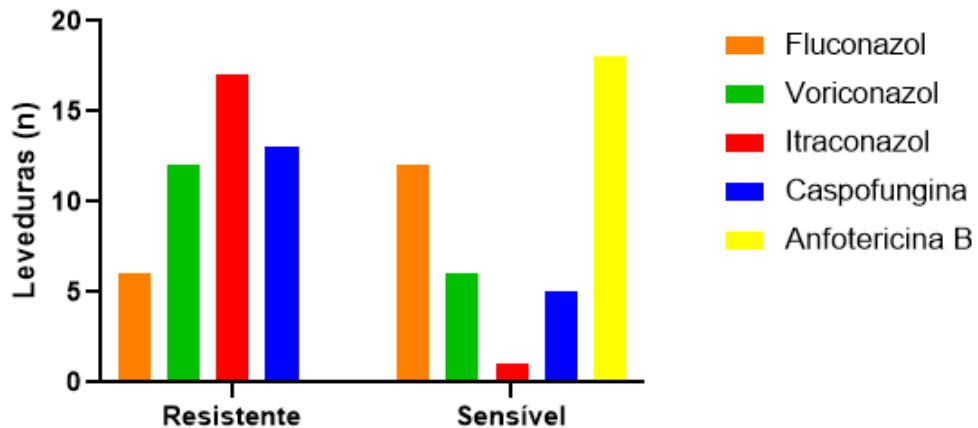
Figura 15: Perfil de resistência x perfil de sensibilidade de *Candida* sp. Resultados com diferença estatística ($p < 0,05$), de acordo com o teste qui-quadrado



Na figura 16 foram separadas as demais espécies de leveduras isoladas com resultado estaticamente significativo ($p < 0,05$) no teste qui-quadrado. Embora a resistência ao itraconazol e a caspofungina seja mais predominante, as leveduras

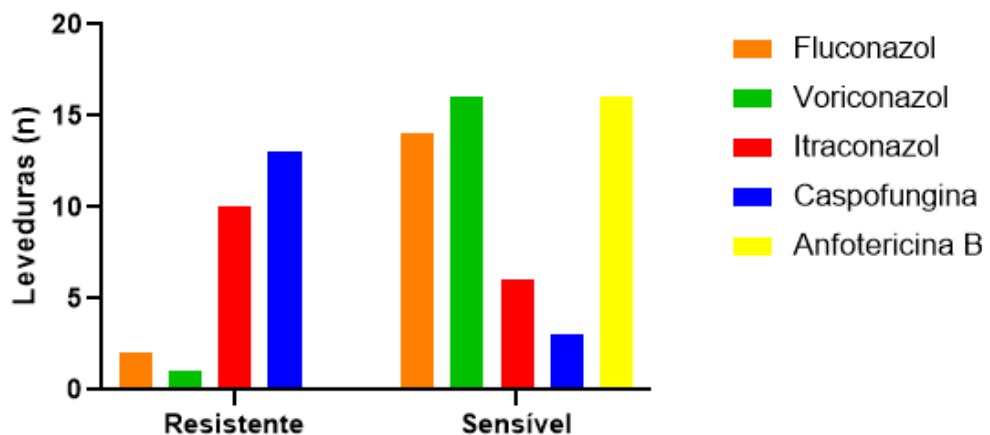
apresentam maior número de isolados resistentes ao quando comparado ao fluconazol.

Figura 16: Perfil de resistência x sensibilidade das demais leveduras. Resultados com diferença estatística ($p < 0,05$), de acordo com o teste qui-quadrado



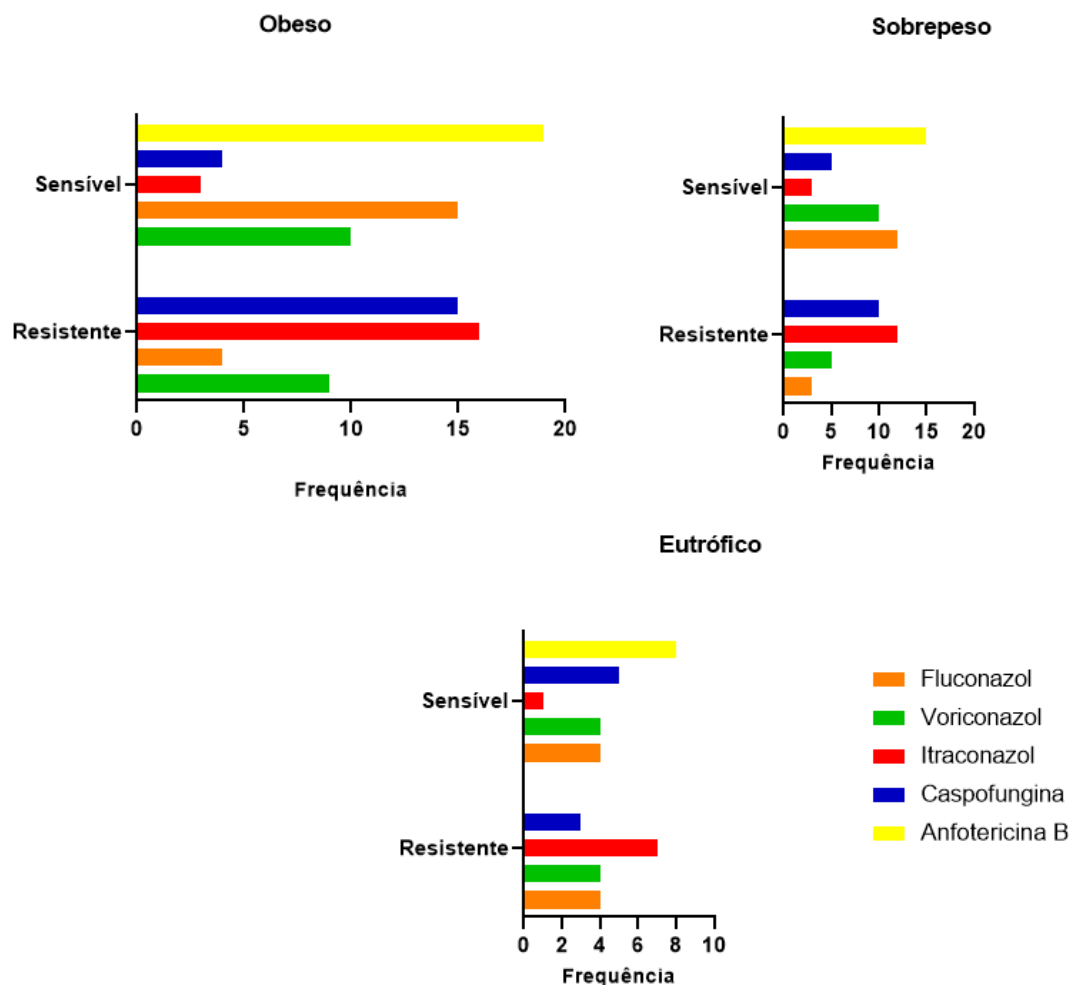
As leveduras do Complexo *C. parapsilosis* apresentaram maior número de isolados resistentes à caspofungina (82 %), o itraconazol é a segunda droga com maior número de isolados resistentes (64,4%). Foram identificados poucos isolados com perfil de resistência ao voriconazol (5,9%) e ao fluconazol (11,7%) (Figura 17).

Figura 17: Perfil de resistência do Complexo *C. parapsilosis*. Resultados com diferença estatística ($p < 0,05$), de acordo com o teste qui-quadrado



Os perfis de susceptibilidade das leveduras foram avaliados pela distribuição por grupo (obeso, sobrepeso e eutrófico). A frequência de isolados resistentes às drogas foi avaliada pelo teste qui-quadrado, observando diferença significativa ($p < 0,05$) para os grupos obeso e sobrepeso. O teste qui-quadrado para o grupo eutrófico não foi válido em decorrência do n amostral baixo. O grupo sobrepeso e obeso apresentou os mesmos dados de perfil de susceptibilidade com maior resistência ao itraconazol, seguida de resistência a caspofungina. Embora não seja estatisticamente significativo, o grupo eutrófico apresentou menor número de isolados resistentes à caspofungina (Figura 18).

Figura 18: Perfil de susceptibilidade das leveduras distribuídas por grupo. Resultados com diferença estatística ($p > 0,05$) para o grupo obeso e sobrepeso, de acordo com o teste qui-quadrado



O fluconazol foi a terceira droga a qual as leveduras avaliadas apresentaram maior número de isolados resistentes (41,5%), sendo que das leveduras avaliadas as espécies de *R. mucilaginosa* e de *Exophiala* sp com 85,7% e 100% de resistência, respectivamente. Os 4 isolados de *Exophiala* sp. estão distribuídos entre os grupos obeso e sobrepeso e os isolados resistentes de *R. mucilaginosa* estão distribuídos nos três grupos (3 isolados resistentes no grupo obesos, 2 isolados resistentes no grupo sobrepeso e 1 isolado resistente no grupo eutróficos). Apenas 2 isolados de *S. cerevisiae* apresentaram resistência ao fluconazol, estes isolados pertencem ao grupo eutrófico (33,3%). O complexo *C. parapsilosis* apresentou resistência de 11,7% ao fluconazol dos 17 isolados avaliados (Tabela 13).

Tabela 13: Perfil de leveduras resistentes ao Fluconazol com distribuição por grupo (eutrófico, sobrepeso e obeso)

		Grupos			
		Eutrófico	Sobrepeso	Obeso	
Número de isolados		5/9	5/15	9/19	
Espécie	N	R	R	R	
<i>C. albicans</i>	4	2 (50)	1(50)	1 (50)	-
<i>C. glabrata</i>	1	RI	-	-	RI
<i>C. intermedia</i>	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	1	RI	-	-	RI
<i>Complexo C. parapsilosis</i>	17	2 (11,7)	-	1(20)	1 (10)
<i>C. pararugosa</i>	1	1 (100)	1 (100)	-	-
<i>Exophiala</i> sp.	4	4 (100)	-	1 (100)	3 (100)
<i>P. manshurica</i>	1	-	-	-	-
<i>R. mucilaginosa</i>	7	6 (85,7)	1 (100)	2(66,6)	3 (100)
<i>S. cerevisiae</i>	6	2 (33,3)	2 (100)	-	-

RI: resistência intrínseca

As leveduras isoladas apresentaram menor número de isolados resistentes ao voriconazol quando comparado às demais drogas avaliadas (Tabela 14). A *R. mucilaginosa* apresentou resistência ao voriconazol em três isolados do grupo obeso

e um isolado do grupo sobrepeso totalizando 66,6% dos isolados resistentes ao voriconazol. As leveduras do complexo *C. parapsilosis* apresentaram 5,9% dos isolados resistentes ao voriconazol, dado ainda menor quando comparado ao perfil de resistência às demais drogas.

Tabela 14: Perfil de leveduras resistentes ao voriconazol com distribuição por grupo (eutrófico, sobrepeso e obeso)

		Grupos			
		Eutrófico	Sobrepeso	Obeso	
Número de isolados		5/9	12/15	17/19	
Espécie	N	R	R	R	R
<i>C. albicans</i>	4	2 (50)	1 (50)	1 (50)	-
<i>C. glabrata</i>	1	1 (100)	-	-	-
<i>C. intermedia</i>	-	-	-	1(100)	-
<i>C. krusei</i>	1	-	-	-	1 (100)
<i>Complexo C. parapsilosis</i>	17	1 (5,9)	2 (100)	4 (80)	10 (100)
<i>C. pararugosa</i>	1	1 (100)	-	-	-
<i>Exophiala sp.</i>	4	-	-	1 (100)	3 (100)
<i>P. manshurica</i>	1	-	1 (100)	-	-
<i>R. mucilaginosa</i>	7	4 (66,6)	1 (100)	2 (66,7)	-
<i>S. cerevisiae</i>	6	2 (33,3)	-	3 (100)	1 (100)

As leveduras foram mais resistentes ao itraconazol com 82,4% de leveduras resistentes à droga. Apenas seis isolados pertencentes ao complexo *C. parapsilosis* não apresentaram resistência ao itraconazol e estes isolados pertencem ao grupo sobrepeso e ao grupo eutrófico (Tabela 15).

Tabela 15: Perfil de leveduras resistentes ao Itraconazol com distribuição por grupo (eutrófico, sobrepeso e obeso)

			Grupos		
			Eutrófico	Sobrepeso	Obeso
Número de isolados			5/9	5/15	9/19
Espécie	N	R	R	R	R
<i>C. albicans</i>	4	4 (100)	2 (100)	2 (100)	-
<i>C. glabrata</i>	1	1 (100)	-	-	1 (100)
<i>C. intermedia</i>	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	1	1 (100)	-	-	1 (100)
<i>Complexo C. parapsilosis</i>	17	11 (64,7)	2 (100)	3(60)	6 (60)
<i>C. pararugosa</i>	1	1 (100)	1 (100)	-	-
<i>Exophiala sp.</i>	4	4 (100)		1 (100)	3 (100)
<i>P. manshurica</i>	1	-		-	-
<i>R. mucilaginosa</i>	7	7 (100)	1 (100)	3 (100)	3 (100)
<i>S. cerevisiae</i>	6	6 (100)	2 (100)	3 (100)	1 (100)

As leveduras apresentaram resistência à caspofungina com 29 isolados resistentes (67,4%). 82% dos isolados de *C. parapsilosis* apresentaram resistência a droga com apenas três isolados sensíveis pertencentes ao grupo obeso (Tabela 16). A anfotericina B foi a única droga antifúngica a qual os isolados não apresentaram resistência.

Tabela 16: Perfil de leveduras resistentes a Caspofungina com distribuição por grupo (eutrófico, sobrepeso e obeso)

			Grupos		
			Eutrófico	Sobrepeso	Obeso
Número de isolados			4/9	10/15	15/19
Espécie	N	R	R	R	R
<i>C. albicans</i>	4	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	1	-	-	-	-
<i>C. intermedia</i>	-	1 (100)	-	1 (100)	-
<i>C. krusei</i>	1	1 (100)	-	-	1 (100)
Complexo <i>C. parapsilosis</i>	17	14 (82)	2 (100)	5 (100)	7 (70)
<i>C. pararugosa</i>	1	-	-	-	-
<i>Exophiala sp.</i>	4	4 (100)	-	1 (100)	3 (100)
<i>P. manshurica</i>	1	1 (100)	1 (100)	-	-
<i>R. mucilaginosa</i>	7	7 (100)	1 (100)	3 (100)	3 (100)
<i>S. cerevisiae</i>	6	1 (100)	-	-	1 (100)

5.4 FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA DAS LEVEDURAS ISOLADAS DA MICROBIOTA INTESTINAL E MULTIRRESISTÊNCIA ÀS DROGAS

As leveduras foram avaliadas quanto a presença de fenótipos de resistência. No total foram identificados sete fenótipos de resistência das leveduras isoladas com resistência a apenas uma droga, resistência simultânea entre 2 drogas, 3 drogas ou 4 drogas ou ausência de resistência (Tabela 17).

No total, 11,63% dos isolados apresentaram resistência a quatro drogas (fluconazol, voriconazol, itraconazol e caspofungina). Leveduras resistentes aos derivados azólicos (fluconazol, voriconazol e itraconazol) foi encontrada em 13,95%.

A resistência simultânea mais frequentemente identificada foi ao itraconazol e caspofungina com resistência em 25,58% dos isolados, seguida da resistência ao fluconazol, itraconazol e a caspofungina (18,61%). A resistência a apenas uma droga foi identificada para a caspofungina (11,63%) e ao itraconazol (11,63%) e três leveduras não apresentaram fenótipo de resistência (6,97%).

No grupo eutrófico, as leveduras apresentaram resistência simultânea mais frequente ao fluconazol, voriconazol e itraconazol (44,45%). O grupo sobrepeso apresentou isolados com resistência simultânea mais frequente ao itraconazol (26,66%). Enquanto o grupo obeso apresentou resistência simultânea mais frequente a caspofungina e itraconazol (31,57%).

Tabela 17: Distribuição dos fenótipos de resistência das leveduras isoladas da microbiota intestinal dos voluntários do estudo

Fenótipo de resistência				Números de isolados			
				N(%)	Eutróficos N(%)	Sobrepeso N(%)	Obeso N(%)
ITR				5 (11,63)	1 (11,11)	4 (26,66)	0
CAS				5 (11,63)	1 (11,11)	3 (20,01)	1 (5,26)
ITR	CAS			11 (25,58)	2 (22,22)	3 (20,01)	6 (31,57)
FLU	VO	ITR		6 (13,95)	4 (44,45)	1 (6,66)	1 (5,26)
FLU	ITR	CAS		8 (18,61)	1 (11,11)	2 (13,33)	5 (26,31)
FLU	VO	ITR	CAS	5 (11,63)	0	2 (13,33)	3 (15,78)

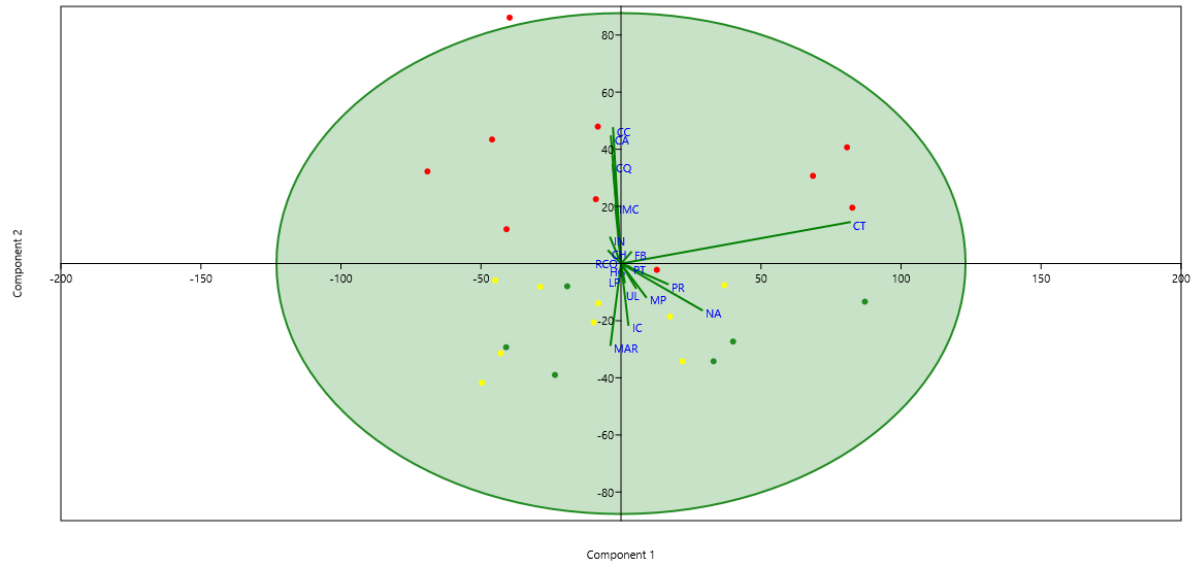
O índice de resistência múltipla a antibióticos (MAR) revelou que 30 isolados (69,8%) apresentaram índice MAR maior que 0,2. O índice MAR é dado pela razão entre o número de antimicrobianos ao qual determinado isolado é resistente pelo número de antimicrobianos isolado foi exposto. A alta prevalência de espécies multirresistentes é atribuída a um MAR maior que 0,2. O grupo eutrófico apresentou 77,7% isolados com índice MAR maior que 0,2, o grupo sobrepeso apresentou 53,3%, e o grupo obeso 78,9% dos isolados com índice MAR maior que 0,2.

Tabela 18: Percentual das leveduras que apresentam multirresistência distribuídas por grupo (eutrófico, sobrepeso e obeso) calculadas pelo índice MAR

Índice MAR	N (%)	Eutróficos N(%)	Sobrepeso N(%)	Obeso N (%)
00	3 (6,9)	0	0	3 (15,8)
0,2	10 (23,3)	2 (22,2)	7 (46,7)	1 (5,3)
0,4	11 (25,6)	2 (22,2)	3 (20)	6 (31,6)
0,6	14 (32,6)	5 (55,6)	3 (20)	6 (31,6)
0,8	5 (11,6)	0	2 (13,3)	3 (15,8)
1	0	0	0	0

A análise do componente principal (PCA) foi realizada para verificar o agrupamento entre o índice de multirresistência às drogas (MAR) e os parâmetros antropométricos, clínicos e nutricionais dos indivíduos dos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso. Foi observado um agrupamento dos indivíduos do grupo obeso correlacionando ao aumento de colesterol total, circunferência abdominal, IMC, circunferência quadril, insulina basal, consumo de carboidratos e uso de xenobióticos. Enquanto os grupos eutrófico e sobrepeso estão relacionados à maior consumo de proteínas, alimentos minimamente processados, ingredientes culinários e maior índice de multirresistência (Figura 20).

Figura 19: Análise do componente principal (PCA) entre o uso de xenobióticos, Índice multirresistência às drogas e os parâmetros clínicos, nutricionais e antropométricos dos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso. Círculos verdes: eutróficos; círculos amarelos: sobrepesos; círculos vermelhos: obesos. Abreviaturas: CT: colesterol total, IN: insulina basal, HG: hemoglobina, MAR: índice de multirresistência, NA: alimentos in natura, MP: minimamente processados, IC: ingredientes culinários, PR: alimentos processados, UL: ultraprocessados, PT: proteínas, LP: lipídeos, FB: fibras, XB: xenobióticos, IMC: índice de massa corporal, CA: circunferência abdominal, CC: circunferência da cintura, CQ: circunferência quadril, CC/CA: relação circunferência da cintura e circunferência do quadril



6 DISCUSSÃO

O uso generalizado de antifúngicos em tratamento de infecções em humanos e animais e a utilização de fungicidas na agricultura provocam a pressão seletiva a diversas espécies fúngicas e promovem a seleção e a disseminação de resistência. Diversos reservatórios estão associados a disseminação de resistência aos antimicrobianos (RAM) como solo, água, rejeitos hospitalares, domésticos, industriais e agrícolas, além da poluição presente em diversos nichos ecológicos (ARASTEHFAR, et al. 2020; ASLAM, et al. 2021).

A resistência aos antimicrobianos é reconhecida como um problema de saúde pública. O conceito de saúde única aborda a RAM de forma multidisciplinar e coordenada na interface humano, animal e meio ambiente. A disseminação de fenótipos de resistência global e local está associada ao uso inadequado de antimicrobianos em animais e humanos, contaminação ambiental e ineficácia de políticas públicas (ASLAN, et al. 2021).

A resistência aos antifúngicos pode estar presente em diversos nichos e a microbiota humana pode ser um reservatório para fenótipos resistentes. Desta forma, o presente estudo recuperou 43 leveduras isoladas da microbiota intestinal de 25 voluntários para determinar o perfil de susceptibilidade dessas leveduras frente as principais drogas antifúngicas utilizadas para tratamento de infecções sistêmicas. A média de idade dos participantes é de 37,8 e 72% pertencem ao sexo feminino recrutados no serviço de nutrição do hospital universitário, na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Os participantes foram classificados como obesos, com sobrepeso e eutróficos, seguindo os critérios da Organização Mundial da Saúde (WHO,2021).

A obesidade é uma doença crônica e multifatorial com interação de fatores sociais, culturais, genéticos e epigenéticos. Na obesidade ocorre um processo inflamatório de baixo grau que promove desregulação imune, disbiose intestinal e diversas comorbidades como diabetes tipo 2, doença cardiovascular, doença renal crônica e hipertensão (LIN, LI, 2021; WHO, 2022).

A microbiota intestinal atua na mediação do efeito do excesso de ingestão alimentar em distúrbios metabólicos como a obesidade por meio da regulação do armazenamento de gordura, captação de energia e modulação de substratos para síntese de gordura armazenável (MUSCOGIURI, 2019; YU, et al. 2022).

O IMC foi utilizado para determinar a obesidade e categorizar os participantes em grupos. O $IMC \geq 30$ está associado a risco aumentado de doença coronariana e mortalidade. No entanto, o IMC não avalia a distribuição de gordura corporal. A gordura corporal é definida pelas medidas de medidas de circunferência de cintura (CC) e relação cintura quadril (RCQ) e seus altos índices estão associados ao risco de síndrome metabólica e complicações cardiometabólicas (KIVIMAKI, et al. 2022).

Os parâmetros laboratoriais avaliados demonstram que as médias dos três grupos estão dentro dos valores de referência. Embora dentro dos valores de referência os parâmetros HDL colesterol e insulina basal apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Os demais parâmetros laboratoriais não apresentaram dados significativos.

Os indivíduos obesos apresentaram menores concentrações de HDL colesterol quando comparado ao grupo eutrófico. Baixos níveis de colesterol HDL e aumento de lipoproteínas ricas de triglicerídeos são comuns na obesidade e caracterizam a dislipidemia aterogênica (STADLER, MARSCHE, 2020). Em um estudo realizado com uma população espanhola foram identificados aumento da ingestão energética e circunferência do quadril em homens que apresentaram um aumento significativo nos parâmetros bioquímicos (triglicerídeos, ALT e $TNF\alpha$) associados ao aumento do estado inflamatório (CUEVAS-SIERRA, et al. 2021).

Os níveis séricos de insulina basal no grupo sobrepeso apresentou maiores valores que os demais grupos. O excesso de tecido adiposo provoca uma inflamação crônica de baixo grau que está relacionada à resistência à insulina e consequentemente ao diabetes (WONDMKUN, 2020). Os demais parâmetros para monitorar e diagnosticar diabetes tipos 2 (HOMA-IR, HOMA- β e glicose) não apresentaram alterações estatisticamente significativas entre os grupos. No entanto, a tendência de aumento da insulina basal pode estar associada a uma maior tendência ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (CASTORINI, et al. 2020; WONDMKUN, 2020).

O consumo de macronutrientes foi avaliado nos participantes do estudo e não houve diferença significativa entre os grupos. A média do consumo dos macronutrientes (carboidratos, proteínas, lipídios e fibras) está dentro do recomendado para a região sudeste brasileira (ARAÚJO, 2013).

A frequência de consumo de alimentos de acordo com o grau de processamento foi avaliada e não foi observado diferença significativa entre os três grupos avaliados. No entanto, o consumo de ultraprocessados dos participantes foi

de 31,79%. Em uma pesquisa realizada por Costa e colaboradores (2021), encontraram um percentual de 18,2% de consumo de ultraprocessados. Em outro estudo, 22,7% de consumo de ultraprocessados foi encontrado por SIMÕES (2018). Em uma população espanhola foi observado o consumo de 21,5% de ultraprocessados para mulheres e 26,3% de consumo de ultraprocessados para homens (CUEVAS-SIERRA, et al. 2021).

Os alimentos ultraprocessados são alimentos que passaram por diversos processos industriais com adição de diversos conservantes, estabilizantes, emulsificantes, solventes, adoçantes, realçadores de sabor e corantes (PAGLIALI, et al. 2021). O aumento do consumo de alimentos ultraprocessados coincide com o aumento da prevalência de obesidade no mundo. Ocorrendo, portanto, uma associação positiva para o consumo de alimentos ultraprocessados e o aumento da ingestão energética total, peso e circunferência do quadril para homens e mulheres (CUEVAS-SIERRA, et al. 2021).

As dietas com alto consumo de alimentos ultraprocessados contribuem para o aumento do estado inflamatório e oxidativo sistêmico de baixo grau (como ocorre na obesidade) e em doenças neurodegenerativas. Em um estudo realizado por CUEVAS-SIERRA e colaboradores (2021), foi demonstrado uma redução da diversidade alfa do componente bacteriano da microbiota intestinal de indivíduos em dieta com baixa composição de fibras como ocorre em dietas à base de ultraprocessados.

A maioria das espécies presentes na microbiota intestinal são originadas da cavidade bucal ou da alimentação como contaminantes dos alimentos. Diversos fatores alteram a homeostase intestinal como a composição dos alimentos ingeridos, utilização de diversos xenobióticos como medicamentos e adoçantes promovendo alterações a curto e longo prazo da composição e da diversidade fúngica (FERROCINO, et al. 2022; TAKAKURA, PIMENTEL, 2020).

O presente estudo avaliou a utilização de xenobióticos como medicamentos e adoçantes. Participantes do grupo obeso reportaram mais utilização de medicamentos anti-hipertensivos. A utilização de antidepressivos, hipoglicemiantes orais e antideslipidêmicos foram reportadas nos grupos obeso e sobrepeso e a utilização de medicamentos não foi reportada no grupo eutrófico. A utilização de adoçantes artificiais, no entanto, foi reportada nos três grupos.

A literatura carece de estudos que definem o efeito da utilização de medicamentos e adoçantes sobre o componente fúngico da microbiota intestinal como

promotores de pressão seletiva que possam desencadear o aumento da identificação de fenótipos de resistência às drogas antifúngicas. Uma revisão realizada por Pant e colaboradores (2022) aponta estudos que demonstram que a utilização de medicamentos como metformina, um antidiabético, podem promover alterações da composição e diversidade do componente bacteriano da microbiota intestinal. Além disso, a mesma revisão aponta que os adoçantes artificiais podem alterar a microbiota intestinal com alterações metabólicas na produção de AGCC, sensibilidade à insulina, inflamação ou alteração do metabolismo lipídico.

A utilização de estatinas pode estar associada a alteração da abundância de espécies bacterianas relacionadas ao metabolismo de ácidos biliares (TUTEJA, FERGUSON, 2019). Em um estudo realizado por Kim e colaboradores (2019) foram associados aumento da abundância de *Bacteroides*, *Butyricimonas* e *Mucispirillum* em camundongos com a utilização de estatinas. Embora estatinas sejam medicamentos utilizados para tratamento de hipercolesterolemia, estudos demonstram seus efeitos antifúngicos ao interferir na biossíntese de ergosterol (LIMA, et al. 2019; MAHMOUD, et al. 2021). Sugerindo que as estatinas podem promover alterações na abundância da micobiota intestinal, embora estudos direcionados para os efeitos da utilização de estatinas sobre a micobiota sejam escassos.

A disbiose intestinal está relacionada a diferentes distúrbios metabólicos como diabetes, doença hepática gordurosa não alcoólica e a obesidade. Na obesidade, a disbiose promove a redução da diversidade e da riqueza do componente bacteriano da microbiota intestinal com redução da abundância de *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides* e aumento da abundância do Filo Firmicutes (CHEN, et al. 2021). E como demonstrando por nosso grupo de pesquisa, o grupo obeso apresenta menor diversidade e riqueza fúngica quando comparado aos indivíduos eutróficos (BORGES, et al. 2018).

No entanto, não há estudos sobre o perfil de susceptibilidade de leveduras isoladas da micobiota intestinal de indivíduos com sobrepeso e obeso. Em um outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa foram relacionados genes marcadores de resistência bacterianos e a microbiota intestinal de indivíduos obesos com presença de maior número de marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos associados a maior IMC (SARMIENTO, et al. 2019).

A seleção e disseminação de espécies microbianas resistentes apresentam relações estreitas com a utilização de antimicrobianos para tratamentos de infecções

em humano em conjunto com a exposição de fungos ambientais a diversos fungicidas agrícolas, antifúngicos utilizados na pecuária e água residuais contaminadas por resíduos de drogas antifúngicas de residências e hospitais. A associação destes fatores promove o acúmulo destes xenobióticos no meio ambiente e conseqüentemente aumentam a exposição e a disseminação de fenótipos de resistência (ASLAM, et al. 2021; PILMES, et al. 2020; STEVENSON, et al. 2022).

Os fungos presentes na microbiota intestinal humana podem ser passageiros, comensais ou colonizadores, são expostos a condições estressantes proporcionadas pelo ecossistema intestinal como temperatura, pH e presença de sais biliares (SCIAVILLA, et al. 2021). Um ambiente intestinal em condições estressoras associado ao uso contínuo e indiscriminado de drogas antifúngicas para tratamento de infecções em humanos e animais e fungicidas na agricultura podem contribuir mesmo de forma indireta na pressão seletiva de espécies fúngicas resistentes na microbiota intestinal.

As leveduras avaliadas no presente estudo foram isoladas e identificadas em um estudo anterior do grupo de pesquisa ao qual foram caracterizados os fungos intestinais cultiváveis da microbiota intestinal de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos. Neste estudo inicial, os grupos eutrófico, sobrepeso e obeso apresentaram amostra diversa, ao qual, o grupo obeso apresentou maior número de espécies fúngicas isoladas como uma característica deste grupo.

Desta forma, foram avaliados o perfil de susceptibilidade de 43 leveduras isoladas da microbiota intestinal de voluntários eutróficos, com sobrepeso e obesos. O grupo obeso apresentou maior número de leveduras com o perfil de susceptibilidade avaliado em decorrência da diferença de amostra previamente identificada neste grupo no estudo anterior.

As drogas selecionadas para avaliar o perfil de susceptibilidade são drogas prescritas no tratamento de infecções sistêmicas amplamente utilizadas em ambiente hospitalar. As drogas selecionadas pertencem às classes dos polienos, triazóis e equinocandinas.

Os polienos foram as primeiras drogas antifúngicas a serem aprovadas para tratamento em infecções sistêmicas por apresentarem amplo espectro. Estão em uso desde de a década 70 e a literatura aponta que a identificação de resistência associada à anfotericina B é rara (CAROLUS, et al. 2020). Nossos dados coincidem com a literatura e as leveduras avaliadas não apresentaram perfil de resistência à droga representante da classe dos polienos, a anfotericina B.

A rara resistência a anfotericina B pode estar associada ao seu uso limitado em decorrência de sua importante toxicidade renal e seus efeitos adversos agudos relacionados à infusão (náusea e febre) e embora raramente pode ser associada a dano hepático. Além disso, Carolus e colaboradores (2020) sugerem que diferente das outras classes de antifúngicos que tem como alvo enzimas essenciais, os polienos, tem como alvo um componente da membrana celular.

A maioria dos isolados apresentou resistência ao itraconazol (81,4%), um triazol de primeira geração. O fluconazol (41,5%) e o voriconazol (32,6%) também foram triazóis avaliados neste estudo, no entanto, apresentaram menor número isolados sensíveis. Os grupos de eutróficos, sobrepeso e obeso apresentaram maior número de isolados resistentes ao itraconazol, com 88,9%, 80% e 78,9% de resistência respectivamente

A utilização dos derivados azólicos vai além da utilização para tratamento de infecções em humanos, sendo aplicados em colchões e na prevenção de pinturas. Utilizados de forma maciça como fungicidas agrícolas na pré-colheita e na preservação de grãos pós-colheita evitando a deterioração. Os inibidores de 14- α -desmetilase (DMIs) são triazóis ambientais que compartilham dos mecanismos de ação dos triazóis de uso na medicina humana e acredita-se que possam atuar na pressão seletiva para surgimento de espécies ambientais resistentes (BASTOS, et al. 2021; BRAUER, et al. 2019).

Os derivados azólicos são a classe de antifúngicos mais utilizados para tratamento de infecções em humanos por apresentarem baixa toxicidade. A resistência aos derivados azólicos é associada a pacientes com histórico de utilização recorrente de antifúngicos em terapias prolongadas. No entanto, isolados resistentes são identificados em pacientes sem terapia prévia com drogas antifúngicas e isolados provenientes de amostras ambientais de solo, plantas e matéria em decomposição (BASTOS, et al. 2021).

Embora o presente trabalho tenha identificado fenótipos de resistência aos triazóis pode-se supor que a resistência possa estar associada a superexpressão do gene CYP51 em decorrência de mutações de inserção ou duplicações na região promotora e aumento da bomba de efluxo nos transportadores de membrana (RIBAS, et al. 2016).

Foi identificada alta taxa de isolados resistentes à caspofungina (44,2%). O grupo obeso e sobrepeso apresentaram respectivamente 66,7% e 78,9% de seus

isolados resistentes enquanto o grupo eutrófico apresentou 44,4% de isolados resistentes. A alta taxa de resistência a caspofungina identificada no estudo pode ser atribuída a ampla utilização para tratamento de infecções sistêmicas (BALASHOV, et al. 2006; PERLIN, 2015). Além disso, os rejeitos hospitalares podem contaminar sistemas aquáticos e sem o tratamento adequado, fenótipos de resistência podem retornar aos seres humanos e animais propagando a resistência de forma contínua.

A caspofungina pertence à classe de drogas antifúngicas com aprovação mais recente, apresenta a limitação de baixa biodisponibilidade oral sendo administrada por via intravenosa (BALASHOV, et al. 2006; MURPHY, BICANIC; 2021). Embora os participantes do estudo tenham sido recrutados no serviço de saúde de um hospital, os mesmos não eram pacientes internados e não apresentavam histórico de internações recentes. O que pode indicar importante disseminação simultânea de fenótipos de resistência à caspofungina, um antifúngico de uso exclusivo em terapias antifúngicas hospitalares.

As mutações nos genes FKS importantes por codificar as subunidades catalíticas da glucana sintase são o mecanismo mais atribuído à resistência encontrada em isolados de leveduras da espécie *Candida* (PERLIN, et al. 2015).

As leveduras foram avaliadas quanto a presença de multirresistência às drogas com identificação de sete fenótipos de resistência nos isolados de leveduras avaliados. O fenótipo mais frequente foi a associação entre resistência ao itraconazol e a caspofungina com 25,6% de leveduras. O grupo obeso apresentou maior resistência a esse fenótipo com 31,6% enquanto os demais grupos de eutróficos e sobrepeso tiveram respectivamente 22,2% e 20% de resistência a este fenótipo. A literatura preconiza a associação entre caspofungina e triazol, normalmente o itraconazol para tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (BALASHOV, et al. 2006; MURPHY, BICANIC; 2021).

O fenótipo mais preocupante foi identificado em 11,6% das leveduras com resistência simultânea entre fluconazol, voriconazol, itraconazol e caspofungina. Embora apresentem um percentual pequeno de multirresistência é considerado um dado preocupante considerando o baixo número de drogas antifúngicas disponíveis para tratamento de infecções sistêmicas. Desta forma, foi realizado o cálculo para avaliar a extensão da gravidade da distribuição de multirresistência em isolados de microrganismos, e 69,8% dos isolados foram considerados multirresistentes por apresentarem resistência a duas drogas ou mais. Considerando a baixa

disponibilidade de classes de drogas disponíveis para tratamento de infecções fúngicas sistêmicas torna-se um dado alarmante e preocupante (AYANDELE, et al. 2020; MANYI-LOH, et al. 2018).

O índice MAR é dado pela razão entre o número de antimicrobianos ao qual determinado isolado é resistente pelo número de antimicrobianos o isolado foi exposto. A alta prevalência de espécies multirresistente é atribuída a um MAR maior que 0,2. Utilizado para avaliar a gravidade da distribuição de resistência em isolados de microrganismos, considerando a baixa disponibilidade de classes de drogas disponíveis para tratamento de infecções fúngicas sistêmicas torna-se um dado alarmante e preocupante (AYANDELE, et al. 2020; MANYI-LOH, et al. 2018).

Os resultados da análise do componente principal entre aumento do índice MAR e os parâmetros antropométricos e nutricionais apontam para uma tendência do aumento do índice MAR estar associado aos grupos eutróficos e sobrepeso. No entanto, a literatura não descreve uma correlação de aumento de índice de multirresistência às drogas e os parâmetros antropométricos.

Pouco se sabe sobre os impactos do fenômeno de resistência aos antifúngicos presentes nas comunidades fúngicas intestinais. Podemos sugerir que o ambiente intestinal é um ecossistema favorável para pressão seletiva de fenótipos fúngicos resistentes em decorrência da utilização de alimentos ultraprocessados que apresentam xenobióticos em sua composição, pela utilização de diversos medicamentos e pela exposição mesmo que de forma indireta aos micropoluentes fungicidas utilizados na agricultura e na pecuária e dispersos pelo meio ambiente como contaminantes.

O ecossistema intestinal recebendo toda essa carga de xenobióticos em associação com a disbiose que ocorre na obesidade podem ser fatores para aumentar a presença de fenótipos de resistência. Embora a quantidade de voluntários no estudo seja baixa, é possível que haja uma relação mesmo que pouco expressiva da quantidade de isolados mais resistentes no grupo dos obesos quando comparado aos grupos eutróficos e sobrepeso.

7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A determinação do perfil de susceptibilidade das leveduras revelou que 81,4% dos isolados foram resistentes ao itraconazol, 67,4% resistentes a caspofungina, 44,2% ao fluconazol, 32,6% resistentes ao voriconazol e não foram identificados isolados resistentes a anfotericina B. A resistência simultânea ao itraconazol e a caspofungina foi a mais identificada nos isolados (25,6%), e a resistência simultânea ao fluconazol, itraconazol, voriconazol e caspofungina foi identificada em 14% dos isolados. Os indivíduos obesos e sobrepeso apresentaram maior número de isolados resistentes ao itraconazol e os indivíduos eutróficos apresentaram uma maior tendência à resistência à caspofungina.

A utilização de xenobióticos pode ter uma relação direta com a pressão seletiva exercida no ecossistema intestinal favorecendo o aumento de espécies resistentes às drogas. Mesmo não sendo determinada a quantidade de xenobióticos presentes na microbiota intestinal dos voluntários é possível que haja uma correlação entre o consumo de xenobióticos e presença de fenótipos de resistência considerando que os xenobióticos podem interferir na homeostase intestinal.

Alterações da diversidade e número de espécies da microbiota intestinal associadas a doenças metabólicas, como ocorre na obesidade, podem ter relação com aumento de fenótipos de resistência mesmo que de forma pouco expressiva.

Outros estudos são necessários para definir o impacto dos xenobióticos e das doenças metabólicas como a obesidade na modulação da microbiota intestinal e sua relação com a presença de espécies fúngicas resistentes. Bem como estudos que determinem a extensão do impacto da utilização de fungicidas agrícolas e seleção de espécies resistentes que possam ser introduzidas na microbiota intestinal como contaminantes de alimentos e também possam estar associadas ao fenômeno de resistência aos antifúngicos utilizados em terapias médicas.

REFERÊNCIA

- ABDELSALAM, et. al. Toxicomicrobiomics: the human microbiome vs. Pharmaceutical, dietary, and environmental xenobiotics. **Frontiers in pharmacology**. v. 11, n. 390, p. 1-17, 2020.
- AMPATZOGLOU, A. et al. Incorporating the gut microbiome in the risk assessment of xenobiotics and identifying beneficial components for one health. **Frontiers in microbiology**. v. 13, n. 872583, p. 1-7, 2022.
- ANSARI, S.; HABOUBI, H.; HABOUBI, N. Adult obesity complications: challenges and clinical impact. **Therapeutic advances in endocrinology and metabolism**. v. 11, p. 1-14, 2020.
- AOUN, A.; DARWISH, F.; HAMOD, N. The influence of the gut microbiome on obesity in adults and the role of probiotics, prebiotics, and synbiotics for weight loss. **Preventive nutrition and food science**. v. 25, n. 2, p. 113-123, 2020.
- ARASTEHAFFAR, A. Drug-resistance fungi: an emerging challenge threatening our limited antifungal armamentarium. **Antibiotics**. v. 9, n. 12, p. 1-29, 2020.
- ARAÚJO, M. C. et al. Macronutrient consumption and inadequate micronutrient intake in adults. **Revista de saúde pública**. v. 47, p. 1-12, 2013.
- ASLAM, et al. Antibiotic resistance: one health world outlook. **Frontiers in cellular and infection microbiology**. v. 11, p. 1-20, 2021.
- AUCHTUNG, T. A.; et al. Temporal changes in gastrointestinal fungi and the risk of autoimmunity during early childhood: the TEDDY study. *Nature communications*. v. 13, n. 3151, p. 1-8, 2022.
- AYANDELE, A. Prevalence of multi-antibiotic resistance Escherichia coli and Klebsiella species obtained from a tertiary medical institution in Oyo State, Nigeria. **Qatar medical journal**. v. 9, n. 1, p. 1-6, 2020.
- BALASHOV, S. V. et al. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in Candida albicans by profiling mutations in FKS1. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. N. 6, n. 60, p. 2058-2063, 2006.
- BASTOS, R. W. et al. Fungicide effects on human fungal pathogens: cross-resistance to medical drugs and beyond. **Plos pathogens**. p. 1-21, 2021.
- BELL, V. et al. One health, fermented foods, and gut microbiota. **Foods**. v. 7, n. 195, p.1-17, 2018.
- BERNARDES, E. V. T. Intestinal fungi are causally implicated in microbiome assembly and immune development in mice. **Nature communications**. n. 2577, p. 1-16, 2020.

BORGES, F. M. *et al.* Fungal diversity of human gut microbiota among eutrophic, overweight, and obese individuals based on aerobic culture – dependent approach. **Current microbiology**. v. 726, n. 6, p. 726-735, 2018.

BRAUER, V. S. *et al.* Antifungal agents in agriculture: friends and foes of public health. **Biomolecules**. v. 9, n. 10, p. 1-21, 2019.

CAROLUS, H. *et al.* Amphotericin B and other polyenes – Discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **Journal of fungi**. v. 6, n. 321, p. 1-21, 2020.

CARRETÉ, *et al.* Patterns of genomic variation in the opportunistic pathogen *Candida glabrata* suggest the existence of mating and a secondary association with humans. **Current biology**. v. 28, n. 1, p. 15-27, 2018.

CASTORINI, M. D. *et al.* Insulin resistance and type 2 diabetes in children. **Annals of Pediatric endocrinology and metabolism**. p. 217-226, 2020.

CAVASSIN, F. B. *et al.* Sixty years of amphotericin B: Na Overview of the main antifungal agent used to treat invasive fungal infections. **Infectious diseases and therapy**. v.10, p. 115-147, 2021.

CECON. Discos de sensibilidade fúngica para antifungograma. Sensifungidisc. São Paulo: Cecon, 2014.

CERDÓ, T. *et al.* The role of probiotics and prebiotics in the prevention and treatment of obesity. **Nutrients**. v. 11, n. 635, p. 1-31, 2019.

CESARE, G. B. *et al.* Antimicrobial peptides: a new frontier in antifungal therapy. **American society for microbiology**. v. 11, n. 6, p. 1-21, 2020.

CHANG, Y. L. *et al.* New facets of antifungal therapy. **Virulence**. v. 2, n. 8, p. 222-236, 2017.

CHEN, Y. *et al.* Role and mechanism of gut microbiota in human disease. **Frontiers in microbiology**. v. 11, p. 1-12, 2021.

CLSI. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts.3 ed. CLSI supplement M44. Pennsylvania: Clinical and laboratory standards institute. 2018.

CLSI. Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeast. 1 ed. CLSI supplement M60. Pennsylvania: Clinical and laboratory standards institute. 2020.

COSTA, C. S. *et al.* Consumption of ultra-processed foods and its association with sociodemographic factors in the adult population of the 27 Brazilian state capitals. **Revista de saúde pública**. v. 55, n. 47, p. 1-9, 2021.

COWEN, L. E. *et al.* Mechanisms of antifungal drug resistance. **Cold spring harbor perspectives in medicine**. v. 5, n.7, p. 1-23, 2015.

CROVESY, L. *et al.* Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. **European journal of clinical nutrition**. P. 1251-1262, 2020.

CUEVAS-SIERRA, A. *et al.* Gut microbiota differences according to ultra-processed food consumption in a Spanish population. **Nutrients**. v. 13, p. 1-20, 2021.

CUNNINGHAM, A. L. *et al.* A Review on gut microbiota: a central factor in the pathophysiology of obesity. **Lipids health disease**. v. 20, n. 65, p. 1-13, 2021.

DELMA, *et al.* Molecular mechanisms of 5-fluorocytosine resistance in yeasts and filamentous fungi. **Journal of fungi**. v. 7, n. 99, p. 1-14, 2021.

DHURANDHAR, N. V. What is obesity? *International journal of obesity*. v. 46, p. 1081-1082, 2022.

FERNANDES, C. M.; *et al.* The future of antifungal drug therapy: novel compounds and targets. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 65, n. 2, p. 1-13, 2021.

FERROCINO, I; *et al.* Mycobiota composition and changes across pregnancy in patients with gestational diabetes mellitus (GDM). **Nature**. v. 12, n. 9192, p. 1-13, 2022.

FISHER, M. C. *et al.* Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**. v. 360, n. 6390, p. 739-742, 2018.

FITZPATRICK, D. A. Horizontal gene transfer in fungi. **FEMS microbiology letters**. v. 329, n. 1, p. 1-8, 2012.

GAO, R.; *et al.* Alteration of gut mycobiota profiles in adenoma and colorectal cancer. **Frontiers in cellular and infection microbiology**. v. 12, P. 1-11, 2022.

GENG, J. *et al.* The links between gut microbiota and obesity and obesity related diseases. **Biomedicine & pharmacotherapy**. v. 147, p. 1-12, 2022.

HOKKEN, M. W. Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi. **Fungal genetics and biology**. v. 132, p. 1-13, 2019.

HOUST, J. *et al.* Antifungal drugs. **Metabolites**. v. 10, n. 106, p. 1-16, 2020.

JACOB, T. R. *et al.* Heat shock protein 90 (Hsp90) as a molecular target for the development of novel drugs against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Frontiers in microbiology**. v. 6, p. 1-10, 2015.

KABWE, M. H.; *et al.* The gut mycobiota of rural and urban individuals is shaped by geography. **BMC microbiology**. v. 20, n. 257, p. 1-12, 2020.

KIM, J. *et al.* Alterations in gut microbiota by statin therapy and possible intermediate effects on hyperglycemia and hyperlipidemia. **Frontiers in microbiology**. v. 10, n. 1947, p. 1-10, 2019.

KIM, J. H. et al. Advances in antifungal development: Discovery of new drugs and drug repurposing. **Pharmaceuticals**. v. 7, n. 787, p. 1-7, 2022.

KIM, M. H.; *et al.* Gut microbiota and metabolic health among overweight and obese individuals. **Scientific reports**. n. 19417, p. 1-11, 2020.

KIVIMAKI, M. Body-mass index and risk of obesity-related complex multimorbidity: an observation multi cohort study. **The lancet diabetes & endocrinology**. v. 10, n. 4, p. 253-263, 2022.

KONSTANTINIDIS, T. et al. Effects of antibiotics upon the gut microbiome: A review of the literature. **Biomedicines**. v. 8, n. 502, p. 1-15, 2020.

LAMBERTH, C. Latest research trends in agrochemical fungicides: any learnings for pharmaceutical antifungals? **Medical chemistry letters**. v. 13, n. 6, p. 895-903, 2022.

LEE, Y, et al. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chem Reviews**. v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2021.

LEE, Y. C. et al. Using machine learning to predict obesity based on genome-wide and epigenome-wide gene-gene and gene-diet interactions. **Frontiers in genetics**. v. 12, p. 1-11, 2022.

LIMA, W. G. et al. Are the statins promising antifungal agents against invasive candidiasis? **Biomedicine & pharmacotherapy**. v. 111, p. 270-281, 2019.

LIN, X.; LI, H. Obesity: epidemiology, pathophysiology, and therapeutics. **Frontiers in endocrinology**. v. 12, p. 1-9, 2021.

LIOFILCHEM. Discs for antifungal susceptibility test of yeasts. Antifungal Disc. Terano: Liofilchem, 2021.

LORENZO, A. *et al.* Why primary obesity is a disease? **Journal of translational medicine**. v. 169, n. 17, p. 1-13, 2019.

LOYSE, A. et al. Flucytosine and cryptococcosis: time to urgently address the worldwide accessibility of a 50-year-old antifungal. **Journal of antimicrobial chemotherapy**. v. 68, p. 2435-2444, 2013.

MAHMOUD, D. E. et al. In vitro study on the potential fungicidal effects of atorvastatin in combination with some azole drugs against multidrug resistant *Candida albicans*. **World journal of microbiology and biotechnology**. v. 37, n. 191, p. 1-13, 2021.

MANYI-LOH, C. et al. Characterisation and antibiotic resistance of selected bacterial pathogens recovered from dairy cattle manure during anaerobic mono-digestion in a balloon-type digester. **Applied sciences**. v. 11, n. 8, p. 1-12, 2018.

- MITEV, K.; TALESKI. Association between the gut microbiota and obesity. **Macedonian journal of medical sciences**. v. 7, n. 12, p. 2050-2056, 2019.
- MORIO, F. et al. Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. **International journal of antimicrobial agents**. v. 50, n. 5, p. 599-606, 2017.
- MURPHY, S. E.; BICANIC, T. Drug resistance and novel therapeutic approaches in invasive candidiasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**. v. 11, n. 759408, p. 1-22, 2021.
- MUSCOGIURI, G. et al. Gut microbiota: a new path to treat obesity. **International journal of obesity supplements**. v.9, p. 10-19, 2019.
- NAMI, S. et al. Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies to treatment of fungal diseases. **Biomedicine & pharmacotherapy**. v. 110, p. 857-868, 2019.
- ORTIZ, P. et al. Impact of cumulative environmental and dietary xenobiotics on human microbiota: risk assessment for one health. **Journal xenobiotics**. v. 1, n. 12, p. 56-63, 2022.
- PAGLIALI, G. et al. Consumption of ultra-processed foods and health status: a systematic review and meta-analysis. **Journal of nutrition**. v. 125, p. 308-318, 2021.
- PANT, A. et al. Human gut microbiota and drug metabolism. **Human microbiome**. p. 1-15, 2022.
- PÉREZ, J. C. Fungi of the human gut microbiota: roles and significance. **International journal of medical microbiology**. v. 311, n. 3, p.1-6, 2021.
- PERLIN, D. S. Echinocandin resistance in Candida. **Clinical infectious diseases**. v. 61, p. 1-6, 2015.
- PILMES, B. et al. Gut microbiota, antibiotic therapy and antimicrobial resistance: a narrative review. **Microorganisms**. v. 8, n. 269, p. 1-17, 2020.
- PISANI, A. et al. Dysbiosis in the gut microbiota in patients with inflammatory bowel disease during remission. **Microbiology spectrum**. p. 1-15, 2022.
- PUGLIESE, G. et al. Obesity and infectious diseases: pathophysiology and epidemiology of a double pandemic condition. **International journal of obesity**. v. 46, p. 449-465, 2022.
- RAO, S.; BHAGATWALA, J. Small intestinal bacterial overgrowth: clinical features and therapeutic management. **Clinical and translational gastroenterology**. v. 10, n. 10, p. 1-14, 2019.
- REINOLD, J. et al. The fungal gut microbiome exhibits reduced diversity and increased relative abundance of Ascomycota in severe COVID-19 illness and distinct

interconnected communities in SARS-CoV-2 positive patients. **Frontiers in cellular and infection microbiology**. v. 12, p. 1-12, 2022.

REVIE, N. M. et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current opinion in microbiology**. v. 45, p. 70-76, 2018.

RIBAS, A. D. R. et al. Is the emergence of fungal resistance to medical triazoles related to their use in the agroecosystems? A mini review. **Brazilian journal of microbiology**. v. 4, n. 47, p. 793-799, 2016.

SAH, S. K. et al. The role of aneuploidy in the emergence of echinocandin resistance in human fungal pathogen *Candida albicans*. **Plos pathogens**. v. 5, n. 17, p. 1-8, 2021.

SANTAMARÍA, D. B.; et al. Therapeutic drug monitoring of antifungal agents in critically ill patients: Is there a need for dose optimisation? **Antibiotics**. v. 11, n. 645, p. 1-24, 2022.

SARMIENTO, M. R. A.; et al. Obesity, xenobiotic intake and antimicrobial-resistance genes in the human gastrointestinal tract: a comparative study of eutrophic, overweight and obese individuals. **Genes**. v. 10, n. 5, p. 1-13, 2019.

SCHEITHAUER, T. P. M. Gut microbiota as a trigger for metabolic inflammation in obesity and type 2 diabetes. **Frontiers in immunology**. 2020.

SCIAVILLA, P. et al. Gut microbiota profiles and characterization of cultivable fungal isolates in IBS patients. **Applied microbiology and biotechnology**. v. 8, n. 105, p. 3277-3288, 2021.

SCORZONI, L. et al. Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. **Frontiers in microbiology**. v. 8, n. 36, p. 1-23, 2017.

SEIFI, Z. et al. Isolation, identification and susceptibility profile of *Rhodotorula* species isolated from two education hospitals in Ahvaz. **Jundishapur journal of microbiology**. v. 6, n. 6, 2013.

SHAFIEI, M. et al. History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. **Bioorganic chemistry**. v. 104, p. 1-21, 2020.

SHANKAR, J. Food habits associated with mycobiota composition and their impact on human health. **Frontiers in nutrition**. v. 8, p. 1-8, 2021.

SIMÕES, B. S. et al. Consumption of ultra-processed foods and socioeconomic position: a cross-sectional analysis of the Brazilian longitudinal study of adult health. **Cadernos de saúde pública**. v. 3, n. 34, p. 1-13, 2018.

STADLER, J. T.; MARSCHKE, G. Obesity-related changes in high-density lipoprotein metabolism and function. **International journal of molecular sciences**. v. 21, n. 8985, p. 1-28, 2020.

STEFANAC, T. Xenobiotics – Division and methods of detection: a review. **Journal of xenobiotics**. v. 11, p. 130-141, 2021.

STEVENSON, E. M.; et al. Antifungal exposure and resistance development: defining minimal selective antifungal concentration and testing methodologies. **Frontiers in fungal biology**. v. 3, n. 918717, p. 1-15, 2022.

TAKAKURA, T.; PIMENTEL, M. Small intestinal bacterial overgrowth and irritable bowel syndrome – An update. **Frontiers in Psychiatry**. v. 11, n. 664, 2020.

THOMAZ, D. et al. Na azole-resistant candida parapsilosis outbreak: clonal persistence in the intensive care unit of a Brazilian teaching hospital. **Frontiers in microbiology**. v. 9, n. 2997, 2018.

TUTEJA, S.; FERGUSON, J. F. The gut microbiome and response to cardiovascular drugs. **Genomic and precision medicine**. v. 9, n. 12, p. 421-429, 2019.

VERWEIJ, P. E. The one health problem of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: current insights and future research agenda. **Fungal biology reviews**. v. 34, n. 4, p. 202-214, 2020.

VETRANI, C.; et al. From gut microbiota through low-grade inflammation to obesity: key players and potential targets. **Nutrients**. v. 14, n. 2103, p. 1- 12, 2022.

WALL, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Current antimycotics, new prospects, and future approaches to antifungal therapy. **Antibiotics**. v. 9, n. 445, p. 1-10, 2020.

WANG, x. et al. Pesticides xenobiotics in soil ecosystems and their remediation approaches. **Sustainability**. v. 14, n. 3353, p. 1-17, 2022.

WHALEY, S. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. **Frontiers in microbiology**. v. 7, n. 2173, p. 1-12, 2017.

WIEDERHOLD, N. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. **Infection and drug resistance**. v. 10, p. 249-259, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Plan to eliminate industrially- produced trans-fatty acids from global food supply. **World health organization**, 2018.

WONDMKUN, Y. T. Obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes: associations and therapeutic implications. **Dovepress**. v. 13, p. 3611-3616, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO World obesity day 2022 – accelerating action to stop obesity. **World Health Organization**, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Obesity and overweight. **World health organization**, 2021.

WU, X., *et al.* Intestinal mycobiota in health and diseases: from a disrupted equilibrium to clinical opportunities. **Microbiome**. v. 2, n. 60, p. 1-18, 2021.

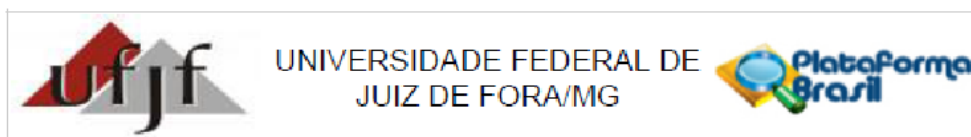
YU, D. *et al.* Dynamics of the gut bacteria and fungi accompanying low-carbohydrate diet-induced weight loss in overweight and obese adults. **Frontiers in nutrition**. v. 9, p. 1-13, 2022.

ZAKIS, *et al.* The evidence for placental microbiome and its composition in healthy pregnancies: A systematic review. **Journal of reproductive immunology**. v. 149, p. 1-12, 2022.

ZATTERALE, F.; *et al.* Chronic adipose tissue inflammation linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Frontiers in physiology**. v. 10, p. 1-20, 2021.

ZHANG, D., *et al.* The mycobiota of the human body: a spark can start a Prairie fire. **Gut microbes**. v. 11, n. 4, p. 655-679, 2020.

ANEXO A - Parecer do comitê de ética em pesquisa- UFJF



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Microbiota, sistema imunológico e obesidade: diversidade microbiana intestinal e parâmetros imunológicos de indivíduos obesos e eutróficos.

Pesquisador: Cláudio Galuppo Diniz

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 23895013.9.0000.5147

Instituição Proponente: Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia/UFJF

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 479.002

Data da Relatoria: 07/11/2013

Apresentação do Projeto:

Apresentação do projeto esta clara e detalhada de forma objetiva. Descreve as bases científicas que justificam o estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Apresenta clareza e compatibilidade com a proposta de estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Identificação dos riscos e as possibilidades de desconfortos e benefícios esperados, estão adequadamente descritos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem estruturado, delineado e fundamentado, sustenta os objetivos do estudo em sua metodologia de forma clara e objetiva, e se apresenta em consonância com os princípios éticos norteadores da ética na pesquisa científica envolvendo seres humanos elencados na resolução 466/12 do CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto está em configuração adequada e há apresentação de declaração de infraestrutura e de concordância com a realização da pesquisa, assinada pelo responsável da instituição onde será realizada a pesquisa. Apresentou de forma adequada o termo de Consentimento Livre e

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 38.038-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 479.002

Esclarecido. O Pesquisador apresenta titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o projeto está aprovado, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em pesquisa estabelecido na Res. 466/12 CNS. Data prevista para o término da pesquisa: 30/11/2015

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto. Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

JUIZ DE FORA, 04 de Dezembro de 2013

Assinador por:
Paulo Cortes Gago
(Coordenador)

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
 Bairro: SAO PEDRO CEP: 38.038-900
 UF: MG Município: JUIZ DE FORA
 Telefone: (32)2102-3788 Fax: (32)1102-3788 E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
36036-900 JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa "MICROBIOTA, SISTEMA IMUNOLÓGICO E OBESIDADE: DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL E PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DE INDIVÍDUOS OBESOS E EUTRÓFICOS".

Nesta pesquisa pretendemos avaliar a diversidade bacteriana, seu perfil funcional e metabólico, e parâmetros imunológicos de indivíduos obesos e eutróficos para o estabelecimento de possíveis correlações entre composição microbiana, atividade imunológica, perfil nutricional e bioquímico, e a obesidade.

De acordo com os órgãos internacionais de saúde, investigações direcionadas ao entendimento dos fatores envolvidos na etiopatologia da obesidade considerando-se aspectos imunológicos e da microbiota residente intestinal deverão contribuir para minimizar o impacto para saúde pública dos custos associados às comorbidades e os custos sociais da doença, dada sua prevalência.

Acreditamos que esta pesquisa possa contribuir para dimensionar a distribuição bacteriana na microbiota residente intestinal de pacientes obesos, seu papel no ecossistema pela determinação dos perfis funcionais e metabólicos, e aspectos da resposta imunológica sistêmica nestes indivíduos.

Esses conhecimentos poderiam contribuir e suscitar discussões sobre o envolvimento destas variáveis na etiologia multifatorial da obesidade e suas comorbidades. Além disso, os resultados podem gerar indicadores para serem usados em correlações entre fatores do comportamento que possam modular microbiota e imunidade, como perfil nutricional e hábitos de vida.

Para este estudo estão sendo convidados adultos obesos não diabéticos assistidos em um serviço de endocrinologia e indivíduos eutróficos recrutados na comunidade. Os participantes responderão a um questionário de dados clínicos e epidemiológicos, serão submetidos à avaliação antropométrica (peso atual, altura, Índice de Massa Corporal, circunferência da cintura, relação entre as circunferências da cintura e do quadril, circunferência do braço, circunferência muscular do braço e percentual de gordura corporal), avaliação nutricional, pela aplicação de um registro alimentar de 3 dias, e coleta de espécimes clínicos (sangue e fezes).

- Considerando-se os riscos envolvendo pesquisa com seres humanos, de acordo com o preconizado pela legislação vigente (resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), o estudo é classificado como de risco mínimo, isto é, o procedimento não acarretará riscos para os participantes, maiores do que aqueles aos quais eles estariam expostos na sua rotina.
- Eventuais desconfortos físicos ou emocionais serão minimizados, uma vez que os dados antropométricos serão obtidos durante consulta de endocrinologia e os espécimes clínicos serão coletados em domicílio (fezes no coletor fornecido) ou laboratório de análises clínicas participante do projeto (sangue), de acordo com a uma guia de convênio fornecida.
- Para participar deste estudo o Sr(a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

- Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão e o (a) Sr(a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, no Instituto de Ciências Biológicas/UFJF, Setor de Microbiologia e a outra será fornecida ao senhor(a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa "MICROBIOTA, SISTEMA IMUNOLÓGICO E OBESIDADE: DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL E PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DE INDIVÍDUOS OBESOS E EUTRÓFICOS", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20 ____ .

Nome	Assinatura participante	Data
------	-------------------------	------

Nome	Assinatura pesquisador	Data
------	------------------------	------

Nome	Assinatura testemunha	Data
------	-----------------------	------

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/UFJF

CAMPUS UNIVERSITÁRIO DA UFJF

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

CEP: 36036-900

FONE: (32) 2102-3788 /E-MAIL: cep.propesq@uff.edu.br

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: PROF. DR. CLÁUDIO GALUPPO DINIZ

DEPTO. PARASITOLOGIA, MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

RUA JOSÉ LOURENÇO KELMER, S/N - CAMPUS UNIVERSITÁRIO

BAIRRO SÃO PEDRO - CEP: 36036-330 - JUIZ DE FORA, MG

E-MAIL: claudio.diniz@uff.edu.br