

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

ROWENA ALVES COELHO

**SUSCEPTIBILIDADE DE *Fonsecaea* spp. AOS
ANTIFÚNGICOS: relações com a produção de melanina
fúngica, associação de fármacos e aspectos clínicos dos
pacientes**

Rio de Janeiro

2017

ROWENA ALVES COELHO

SUSCEPTIBILIDADE DE *Fonsecaea* spp. AOS
ANTIFÚNGICOS: relações com a produção de melanina
fúngica, associação de fármacos e aspectos clínicos dos
pacientes

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto
Nacional de Infectologia Evandro Chagas
para obtenção do grau de mestre em
Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida
Paes
Coorientador: Prof. Dr. Dayvison Francis
Saraiva Freitas

Rio de Janeiro

2017

Coelho, Rowena Alves.

SUSCEPTIBILIDADE DE *Fonsecaea spp.* AOS ANTIFÚNGICOS: relações com a produção de melanina fúngica, associação de fármacos e aspectos clínicos dos pacientes / Rowena Alves Coelho. - Rio de Janeiro, 2017.

97 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2017.

Orientador: Rodrigo Almeida-Paes.

Co-orientador: Dayvison Francis Saraiva Freitas.

Bibliografia: f. 80-95

1. antifúngicos. 2. cromoblastomicose. 3. *Fonsecaea*. 4. melanina. I. Título.

ROWENA ALVES COELHO

SUSCEPTIBILIDADE DE *Fonsecaea* spp. AOS ANTIFÚNGICOS: RELAÇÕES COM A
PRODUÇÃO DE MELANINA FÚNGICA, ASSOCIAÇÕES DE FÁRMACOS E
ASPECTOS CLÍNICOS DOS PACIENTES

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes.

Coorientador: Prof. Dr. Dayvison Francis Saraiva Freitas.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Rosely Maria Zancopé Oliveira (Presidente)

Prof. Dr. Márcio Lourenço Rodrigues

Prof^ª. Dr^ª. Maria Clara Gutierrez Galhardo

Prof^ª. Dr^ª. Livia de Souza Ramos (Revisora/Suplente)

Dedico este trabalho

Aos meus amados pais, Regina Célia Siller Alves Coelho e Roberto Mazzaro Coelho,
e ao meu querido irmão Matheus Alves Coelho,
por todo amor, constante incentivo e ajuda em todos os momentos da minha vida.

Ao meu querido esposo, Wender dos Santos Marinho,
pelo carinho, paciência e compreensão.

À minha querida filhinha Rebeca, o motivo da minha alegria.

“A ciência sem a religião é manca; a religião sem a ciência é cega”
Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por me dar forças para concluir mais uma etapa da minha carreira.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes pela amizade, confiança, incentivo, ensinamentos e apoio na realização deste trabalho, além de estar sempre presente na minha vida profissional e pessoal.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Dayvison Francis Saraiva Freitas por todo apoio, atenção e valiosa contribuição na parte clínica deste trabalho.

Aos professores, Dr. Márcio Lourenço Rodrigues, Dr^a. Rosely Maria Zancopé Oliveira e Dr^a. Maria Clara Gutierrez Galhardo por acompanharem este trabalho e aceitarem compor minha banca avaliadora.

À Prof^a. Dr^a. Livia Souza Ramos pela revisão deste trabalho, pelas valiosas correções, dicas e sugestões.

À Prof^a. Dr^a. Lucimar Ferreira Kneipp, pelas críticas e sugestões na avaliação deste trabalho durante o seminário científico II do mestrado.

Aos meus amados amigos, Maria Helena Galdino Figueiredo de Carvalho e Fábio Brito dos Santos, com os quais tenho o prazer de conviver, pelas injeções de ânimo, amizade, ajuda, ensinamentos e conselhos na vida científica e pessoal.

À querida Juliana Vitoria dos Santos Silva, aluna PIBIC que me acompanhou e ajudou em vários momentos na execução dos experimentos, pela disponibilidade, pontualidade, compromisso e dedicação constantes.

Aos alunos do laboratório, Iara Bastos de Andrade, Jonas Pereira Campos e Marcelly Nonato Macena de Sousa Lima que em vários momentos colaboraram para conclusão deste trabalho.

Aos amigos, Mônica dos Santos Elias, Vanessa Brito de Souza Rabello, Luã Cardoso de Oliveira, Marcos de Abreu Almeida, Priscila Marques de Macedo e Fernando Almeida da Silva pelas conversas descontraídas e constante incentivo, e a todos os colegas dos Laboratórios de Micologia Ambiental e Imunodiagnóstico.

Às colaboradoras da Plataforma de Sequenciamento Genômico de DNA PDTIS/Fiocruz pela execução do sequenciamento dos isolados deste estudo.

À Dr^a. Luciana Trilles e Dr. Wieland Meyer pela assessoria nas análises genotípicas.

Ao Dr. Leonardo Silva Barbedo pela ajuda nas fotografias das microscopias apresentadas neste trabalho.

Aos amigos Gilberto Reis e Mônica Martins Bastos por sempre se mostrarem solícitos e dispostos a ajudar na confecção dos meios de cultivo e esterilização de materiais.

À querida Carla Pena sempre prestativa, atenciosa e solícita em todos os momentos.

Ao Dr. Antônio Carlos Francesconi do Valle e Felipe Maurício Soeiro Sampaio por gentilmente cederem as fotos dos pacientes incluídos neste estudo.

Aos meus amados pais, irmão e esposo pelo constante apoio e parceria no cuidado com minha pequena nos momentos em que estive ausente para estudar.

À coordenação da Pós-Graduação do INI, a todos os professores e a todos os colegas de turma pelo constante apoio e palavras de incentivo.

À querida Priscilla Tavares de Sá por toda atenção e ajuda na parte burocrática do curso de pós-graduação.

A todos que de alguma forma ajudaram e incentivaram na conclusão deste trabalho, o meu eterno agradecimento.

COELHO, R. A. **Susceptibilidade de *Fonsecaea* spp. aos antifúngicos: relações com a produção de melanina fúngica, associação de fármacos e aspectos clínicos dos pacientes.** Rio de Janeiro, 2017. 97 fls. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose crônica que afeta a pele, tecidos subcutâneos e apresenta distribuição global, com predominância em áreas rurais de países tropicais e subtropicais. No Brasil, o gênero *Fonsecaea* é o principal responsável pela CBM. *Fonsecaea pedrosoi*, *F. nubica*, *F. monophora* e *F. pugnaci* só se diferenciam entre si por análises genotípicas, já que fenotipicamente são muito semelhantes. Os agentes de CBM produzem e secretam melanina, importante fator de virulência em vários fungos patogênicos. O acúmulo de melanina proporciona resistência e integridade à parede celular frente a diversos compostos químicos, dentre os quais podem estar incluídos os fármacos antifúngicos. O tratamento da CBM, em geral, é longo e sujeito a recaídas, com muitos casos crônicos altamente resistentes à terapia. Várias formas de intervenção são relatadas na literatura e não há um padrão-ouro de tratamento. Assim, a avaliação *in vitro* da susceptibilidade aos agentes antifúngicos pode ser uma forma de orientar o tratamento desta micose. Os objetivos desse estudo foram avaliar a susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos, isoladamente ou em combinação, de 20 isolados obtidos de 17 pacientes com CBM, investigar a influência da melanina fúngica na susceptibilidade desses isolados e verificar possíveis relações entre susceptibilidade e resposta terapêutica dos pacientes. A caracterização molecular dos isolados foi realizada com base na amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA, na qual foram identificadas três espécies: *F. monophora* (n=10), *F. pedrosoi* (n=5) e *F. nubica* (n=5). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* foi realizada pelo método da microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo M38-A2 recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Os fármacos testados foram: anfotericina B (AMB), flucitosina (5-FC), terbinafina (TRB), fluconazol (FLZ), itraconazol (ITZ), cetoconazol (KTZ), posaconazol (PSZ), voriconazol (VRZ), ravuconazol (RVZ), caspofungina (CAS) e micafungina (MFG). TRB e VRZ apresentaram boa atividade *in vitro*, enquanto os fármacos FLZ, 5-FC, AMB e MFG apresentaram CIMs mais elevadas. Foi estudada a associação de ITZ/TRB, AMB/5-FC e ITZ/CAS pelo método tabuleiro de xadrez, e observou-se interação sinérgica de três isolados de *F. monophora* frente à combinação AMB/5-FC. Os pacientes apresentaram CBM moderada ou grave e a terapia com ITZ não foi suficiente para cura completa na maioria dos casos, exigindo abordagens cirúrgicas adjuvantes. Foi avaliado o efeito da inibição da melanina pelo triciclazol na susceptibilidade aos fármacos que apresentaram elevados CIMs no teste *in vitro*. O fármaco 5-FC apresentou uma melhor atividade frente aos isolados não melanizados. Em contrapartida, MFG e FLZ não mostraram atividade na maioria dos isolados, havendo uma diminuição da ação do fármaco após inibição da melanina. Os resultados deste estudo apontam para uma predominância de *F. monophora*, que é a segunda espécie de *Fonsecaea* da América do Sul, em pacientes atendidos no INI/Fiocruz, especialmente naqueles nascidos e residentes no estado do Rio de Janeiro, Brasil (100%). TRB e VRZ, bem como a associação AMB/5-FC, podem ser melhor estudados no contexto clínico da CBM devido às baixas CIMs e sinergismo, respectivamente.

Palavras-chave: 1. antifúngicos; 2. cromoblastomicose; 3. *Fonsecaea*; 4. melanina

COELHO, R. A. **Susceptibility of *Fonsecaea* spp. to antifungals: relations with fungal melanin production, drug association and clinical aspects of patients.** Rio de Janeiro, 2017. 97 fls. Dissertation [Master's Degree in Clinical Research in Infectious Diseases] - Evandro Chagas National Institute of Infectology.

ABSTRACT

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic mycosis that affects the skin, subcutaneous tissues and presents a global distribution, predominantly in rural areas of tropical and subtropical countries. In Brazil, the *Fonsecaea* genus comprises the major agents of CBM. *Fonsecaea pedrosoi*, *F. nubica*, *F. monophora*, and *F. pugnacius* differ only by means of genotypic analysis, since they are phenotypically very similar. The CBM agents produce and secrete melanin, an important virulence factor for several pathogenic fungi. The accumulation of melanin provides to the cell wall resistance and integrity against several chemical compounds, possibly also including antifungal drugs. The treatment of CBM in general is long and refractory, with many chronic cases highly resistant to therapy. Several forms of intervention are reported in the literature and there is no gold standard of treatment. Thus, the evaluation of *in vitro* susceptibility to antifungal agents may be a way to guide the treatment of this mycosis. The objectives of this study were to evaluate the *in vitro* susceptibility to antifungal drugs, isolated or in combination, of 20 isolates obtained from 17 patients with CBM, to investigate the influence of fungal melanin on the susceptibility of these isolates and to verify possible relationships between susceptibility and therapeutic response of the patients. The molecular characterization of the isolates was performed based on the amplification and sequencing of the ITS region rDNA, in which we identified three species: *F. monophora* (n=10), *F. pedrosoi* (n=5), and *F. nubica* (n=5). The *in vitro* minimal inhibitory concentration (MIC) determination was performed by the broth microdilution method, according to the M38-A2 protocol recommended by the *Clinical and Laboratory Standards Institute*. The drugs tested were amphotericin B (AMB), flucytosine (5-FC), terbinafine (TRB), fluconazole (FLZ), itraconazole (ITZ), ketoconazole (KTZ), posaconazole (PSZ), voriconazole (VRZ), ravuconazole (RVZ), caspofungin (CAS) and micafungin (MFG). TRB and VRZ showed good activity *in vitro*, while FLZ, 5-FC, AMB and MFG presented higher MICs. The association of ITZ/TRB, AMB/5-FC and ITZ/CAS was studied by the checkerboard method, and a synergistic interaction of three *F. monophora* isolates was observed against the AMB/5-FC combination. Patients had moderate or severe CBM and ITZ therapy was not sufficient for complete cure in most of the CBM cases, requiring adjuvant surgical approaches. The effect of melanin inhibition by tricyclazole on susceptibility to drugs that showed high MICs in the *in vitro* test was evaluated. The drug 5-FC presented a better activity against non-melanized isolates. On the other hand, MFG and FLZ showed no activity in most isolates, with a decrease in the action of the drug after inhibition of melanin. The results of this study point to a predominance of *F. monophora*, which is the second *Fonsecaea* species in South America, in patients attending INI/Fiocruz, especially those born and residing in the state of Rio de Janeiro, Brazil (100%). TRB and VRZ, as well as the AMB/5-FC association, may be better studied in the clinical context of CBM due to low MICs and synergism, respectively.

Keywords: 1. antifungal drugs; 2. chromoblastomycosis; 3. *Fonsecaea*; 4. melanin

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FC	- Flucitosina
AMB	- Anfotericina B
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
CAS	- Caspofungina
CBM	- Cromoblastomicose
CC	- Controle de Crescimento
CE	- Controle do Meio de Cultivo
CEM	- Concentração Efetiva Mínima
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTZ	- Cetoconazol
ADN	- Ácido Desoxiribonucleico
dATP	- Deoxi-Adenosina Trifosfato
dCTP	- Deoxi-Citosina Trifosfato
dGTP	- Deoxi-Guanidina Trifosfato
DHN	- Dihidroxinaftaleno
DMSO	- Dimetilsulfóxido
dNTP	- Deoxi-Nucleotídeo Trifosfato
dTTP	- Deoxi-Timina Trifosfato
EDTA	- <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	- Fundação Oswaldo Cruz
FLZ	- Fluconazol
HIV	- <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
ICIF	- Índice da Concentração Inibitória Fracionada
INI	- Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
ISHAM	- <i>International Society for Human and Animal Mycology</i>
ITS	- <i>Internal Transcribed Spacer</i>
ITZ	- Itraconazol
MFG	- Micafungina
MOPS	- <i>3-[N-morpholino] Propanesulfonic Acid</i>

NCBI	- <i>National Center for Biotechnology Information</i>
PDA	- Potato Dextrose Ágar
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PSZ	- Posaconazol
rADN	- Ácido Desoxiribonucleico Ribossomal
RNA	- Ácido Ribonucleico
RPMI	- <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RVZ	- Ravuconazol
SDS	- <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SPSS	- <i>Statistical Package for the Social Science</i>
TBE	- Tris Borato-EDTA
TCZ	- Triciclazol
TRB	- Terbinafina
Tris	- Tris (Hidroximetil) Aminometano
UFC	- Unidade Formadora de Colônias
VRZ	- Voriconazol

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição global de CBM baseada em séries de casos.	18
Figura 2	Conidióforos do tipo cladospório de cadeia curta presentes em <i>Fonsecaea</i> spp.	21
Figura 3	Corpo muriforme.	22
Figura 4	Esquema da via DHN de produção de melanina em fungos.	28
Figura 5	Mecanismo de ação dos principais fármacos antifúngicos atuais com seus respectivos alvos moleculares na célula fúngica.	32
Figura 6	Técnica de microcultivo para análise microscópica de fungos filamentosos.	38
Figura 7	Fluxo de trabalho proposto para identificar fungos patogênicos humanos e animais.	41
Figura 8	Esquema de diluição de anfotericina B, cetoconazol, itraconazol, terbinafina, posaconazol, ravuconazol e voriconazol pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (M38-A2).	44
Figura 9	Esquema de diluição de fluconazol e flucitosina pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (M38-A2).	45
Figura 10	Série de diluição de caspofungina <i>versus</i> oito isolados de <i>Aspergillus</i> após 24 horas de incubação.	47
Figura 11	Esquema das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) dos fármacos em combinação.	49
Figura 12	A e B: Aspecto macromorfológico de <i>Fonsecaea</i> spp. em meio ágar batata dextrose. C: Aspecto micromorfológico pela técnica de microcultivo em lâmina de <i>Fonsecaea</i> spp.	52
Figura 13	Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança.	54
Figura 14	Gráficos do perfil de susceptibilidade <i>in vitro</i> aos fármacos. A: Todos os isolados de <i>Fonsecaea</i> spp. B: Isolados de <i>F. pedrosoi</i> . C: Isolados de <i>F. nubica</i> .	57
Figura 15	Paciente 15 apresentando placa predominantemente verrucosa	62

sobre o joelho direito – CBM moderada.

- Figura 16 Crescimento de *Fonsecaea* spp. em ágar batata dextrose com diferentes concentrações de triciclazol. 65
- Figura 17 Crescimento de *Fonsecaea pedrosoi* (isolado 16751-1) na presença de triciclazol 8 mg/L em ágar batata dextrose. 65
- Figura 18 Gráficos da taxa de sobrevivência dos isolados testados frente aos fármacos anfotericina B, flucitosina, fluconazol e micafungina com a produção de melanina inibida. 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lista dos <i>primers</i> usados para amplificação e sequenciamento.	40
Tabela 2	Valores de CIM/CEM de 11 fármacos antifúngicos para isolados clínicos de <i>Fonsecaea</i> spp.	55
Tabela 3	Valores de ICIF de três combinações de antifúngicos frente a 20 isolados clínicos de <i>Fonsecaea</i> spp.	59
Tabela 4	Dados dos 17 pacientes com CBM incluídos nesse estudo.	61
Tabela 5	Identificação molecular do fungo, CIMs dos fármacos utilizados, tratamento realizado e desfecho clínico dos 12 pacientes acompanhados no INI.	63
Tabela 6	Influência da inibição da melanina na susceptibilidade aos antifúngicos.	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	A CROMOBLASTOMICOSE	16
1.2	EPIDEMIOLOGIA	17
1.3	AGENTES DA CROMOBLASTOMICOSE: <i>Fonsecaea</i> spp.	20
1.4	PATOGENIA	22
1.5	QUADRO CLÍNICO	24
1.6	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Fonsecaea</i> spp.	26
1.7	PRODUÇÃO DE MELANINA POR <i>Fonsecaea</i> spp.	27
1.8	TRATAMENTO	29
1.9	FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS	31
2	RELEVÂNCIA	35
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	APROVAÇÃO ÉTICA	37
4.2	ISOLADOS CLÍNICOS E PACIENTES	37
4.3	REISOLAMENTO	38
4.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	39
4.4.1	EXTRAÇÃO DO ADN	39
4.4.2	AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1- 5.8-ITS2 DO ADN RIBOSSOMAL (rADN)	39
4.5	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE <i>in vitro</i> AOS ANTIFÚNGICOS	42
4.5.1	ANTIFÚNGICOS ISOLADOS	42
4.5.2	COMBINAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS: MÉTODO TABULEIRO DE XADREZ	47
4.6	INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DA MELANINA	50
4.7	EFEITOS DA MELANINA NA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA	50
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5	RESULTADOS	52

5.1	REISOLAMENTO	52
5.2	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	52
5.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	55
5.4	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONAL (ICIF)	58
5.5	CORRELAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL	60
5.6	INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DA MELANINA	64
5.7	EFEITOS DA MELANINA NA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA	65
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
	ANEXOS	96
	ANEXO A- Intervalo de concentração inibitória mínima e concentração efetiva mínima para os diferentes fármacos antifúngicos frente às cepas de referência de <i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019), <i>C. krusei</i> (ATCC 6258) e <i>A. flavus</i> (ATCC 204304) utilizadas nesse estudo.	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 A CROMOBLASTOMICOSE

A cromoblastomicose (CBM) é uma infecção fúngica crônica do tecido cutâneo e subcutâneo causada por implantação traumática de várias espécies de fungos demáceos (AMEEN, 2009).

O início da pesquisa científica sobre a CBM se deu em 1911 na cidade de São Paulo, Brasil. A doença foi relatada em 1914 por Maximiliano Willibaldo Rudolph, que escreveu o artigo *Über die Brasilianische Figueira* ("Sobre a figueira brasileira") em um jornal alemão (RUDOLPH, 1914; CASTRO; CASTRO, 2009). Pedroso e Gomes (PEDROSO; GOMES, 1920) observaram casos de dermatite verrucosa em quatro pacientes. Foi evidenciada a presença de células acastanhadas esféricas em espécimes de biópsia de pele, correspondendo a células muriformes atuais, concluindo o diagnóstico de CBM. A doença foi inicialmente considerada como estreitamente associada à blastomicose e, conseqüentemente, os autores chamaram a doença de blastomicose negra. O cultivo de amostras das lesões cutâneas dos pacientes produziu colônias fúngicas escuras, que mais tarde foram classificadas como *Phialophora verrucosa* (RIPPON, 1988). Em 1915, Lane e Medlar, em publicações separadas, relataram o primeiro caso norte-americano de CBM, que foi observado em um paciente italiano que vivia em Boston, Massachusetts (LANE, 1915; MEDLAR, 1915). O paciente apresentou lesão em placa violácea verrucosa na nádega direita semelhante a tuberculose verrucosa, mas as células muriformes foram visualizadas no exame histopatológico. Lane descreveu a doença como "uma nova blastomicose", enquanto Medlar classificou o isolado como *P. verrucosa* (LANE, 1915; MEDLAR, 1915). Depois de estudar os isolados dos casos brasileiros relatados por Pedroso e Gomes, Brumpt concluiu que não eram compatíveis com *P. verrucosa*, mas pertenciam a uma nova espécie, *Hormodendrum pedrosoi* (BRUMPT, 1922). Em 1936, na Argentina, Pablo Negroni, após estudos micológicos detalhados de agentes de CBM, criou o gênero *Fonsecaea* e validou a espécie *Fonsecaea pedrosoi* (NEGRONI, 1936).

O nome "cromoblastomicose" foi empregado pela primeira vez em 1922, por Terra e colaboradores para diferenciar uma doença fúngica cutânea observada no Brasil da síndrome clínica confusa denominada "dermatite verrucosa" (TERRA et al., 1922). Como o novo nome "cromoblastomicose" sugere que os agentes etiológicos da doença apresentam formas de brotamento de levedura em tecidos, Moore e Almeida propuseram uma nova denominação,

"cromomicose", como substituto de "cromoblastomicose" (MOORE; ALMEIDA, 1935). Com o tempo, o nome cromomicose foi usado para abranger um grupo heterogêneo e diverso de doenças micóticas causadas por um amplo espectro de fungos melanizados. Este problema foi finalmente corrigido em 1974 por Ajello e colaboradores, que criaram um novo termo, "phaeohyphomycosis" (feohifomicose), para definir todas as infecções causadas por fungos demáceos clinicamente e patologicamente distintas da cromoblastomicose (AJELLO et al., 1974). Historicamente, várias denominações têm sido atribuídas a esta doença: cromomicose, micose de Carrión, blastomicose negra, dermatite verrucosa, micose de Lane-Pedroso, doença de Fonseca, doença de Pedroso, feoesporotricose, cladosporiose, figueira, formigueiro, pé-musgo, etc. (LACAZ et al., 2002; LUPI; TYRING; MCGINNIS, 2005). Atualmente, a doença é mais conhecida como cromomicose ou cromoblastomicose, sendo o primeiro o nome da doença conforme descrito na Classificação Internacional de Doenças (CID-10) e o último, o nome definido em consenso de micologistas com *expertise* nesta doença (LÓPEZ MARTÍNEZ; MÉNDEZ TOVAR, 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as Doenças Tropicais Negligenciadas incluem uma série de doenças endêmicas que prevalecem em áreas tropicais ou subtropicais em todo o mundo. A prevalência dos agentes causadores está ligada à pobreza e à falta de saneamento adequado. Considerando a sua distribuição global, seu impacto sobre a população empobrecida e sua refratariedade, a CBM vem sendo relatada na literatura como uma doença negligenciada (QUEIROZ-TELLES, 2015). Em 2017, após o Décimo Encontro do Grupo Consultivo Estratégico e Técnico da OMS para Doenças Tropicais Negligenciadas, a CBM foi adicionada ao *portfolio* das doenças tropicais negligenciadas na categoria B, junto com micetoma e outras micoses profundas (WHO, 2017).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

O peso global da CBM é comparável ou maior que o do micetoma. Esta doença raramente ocorre antes da adolescência, sendo a maioria dos pacientes homens de 40 a 50 anos, com proporções de sexo masculino e feminino variando de 5:1 a 9:1. A maior prevalência da doença está dentro de uma zona entre 30° de latitude norte e 30° de latitude sul, coincidindo com a maioria dos climas tropicais e subtropicais. Poucos inquéritos

epidemiológicos foram feitos, então a maioria dos dados deriva de séries de casos publicados (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Suas taxas de incidência variam de 1:6.800 (14/100.000) (Madagascar) a 1/8.625.000 (0,012/100.000) (EUA). No Brasil, a taxa de incidência estimada para esta doença é de 3/100.000. A maioria dos casos relatados ocorrem na América Latina, Caribe, Ásia, África e Austrália. Madagascar, Brasil, México, República Dominicana, Venezuela, Índia e sul da China reportam a maioria dos casos. Tem sido relatado em todos os países da América do Sul, exceto o Chile. Os casos são regularmente identificados no Sri Lanka, no Paquistão, na Tailândia e na Malásia, bem como no sul da China, em toda a Índia e no Japão. Na África, a maioria dos casos foi relatada em Madagascar, com números substanciais também no Gabão e no leste da África do Sul. Estes são mostrados no mapa da figura 1 (GAFFI, 2016; AGARWAL et al., 2017; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

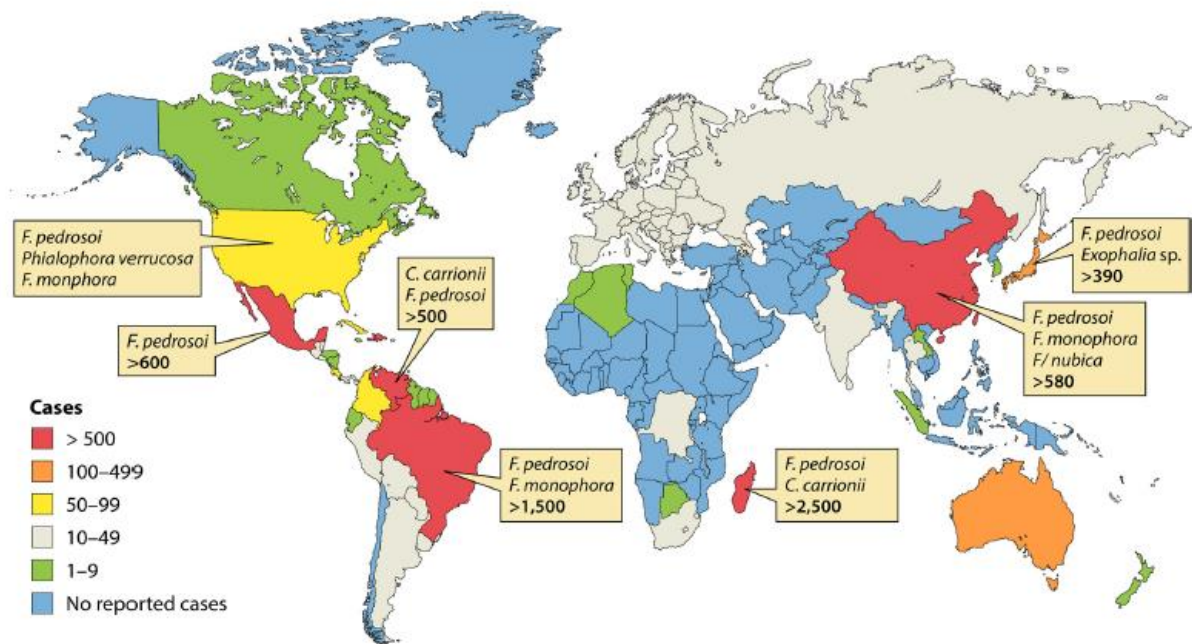


Figura 1: Distribuição global de CBM baseada em séries de casos. Fonte: QUEIROZ-TELLES et. al., 2017.

A doença é causada por fungos que habitam o solo, plantas, flores e madeira, mas são difíceis de isolar do meio ambiente. *Fonsecaea pedrosoi* é o patógeno mais comum associado à doença em áreas tropicais com alta precipitação. No entanto, no sul da China, todos os casos estão associados a *Fonsecaea nubica*. *Phialophora verrucosa* é o segundo fungo mais prevalente. *Cladophialophora carrionii* é o agente mais importante em países secos e desertos da Austrália, África do Sul e Cuba. *Rhinoctadiella aquaspersa* é um agente pouco frequente,

assim como *Wangiella dermatitidis*, *Exophiala spinifera* e *Cladophialophora boppii*. A CBM é uma doença ocupacional que afeta principalmente trabalhadores agrícolas, trabalhadores florestais, jardineiros, vendedores de produtos agrícolas e outros trabalhadores expostos a materiais vegetais contaminados. A falta de sapatos, luvas ou vestuário de proteção, em associação com hábitos higiênicos ruins e nutrição deficiente, provavelmente favorece a aquisição por implantação e perpetuação da doença. No Brasil, a colheita do coco de babaçu (*Orbignya phalerata*) foi um importante epicentro da doença e na Índia, a CBM está ligada ao cultivo de chá preto em Assam e plantações de borracha em Kerala e Western Ghats (CHANDRAN; SADANANDAN; SOBHANAKUMARI, 2012; AGARWAL et al., 2017; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

No Brasil, a CBM é endêmica em muitas áreas geográficas, especialmente na região norte, onde 872 casos foram relatados retrospectivamente nas últimas décadas (SILVA et al., 1992; SILVA; DE SOUZA; ROZENTAL, 1998; QUEIROZ-TELLES et al., 2011; PIRES et al., 2012). Embora 332 casos tenham sido reportados de outros estados do país, foi observada uma diminuição significativa no número de novos casos de CBM, especialmente na região sul do país (LONDERO; RAMOS, 1976; MINOTTO et al., 2001). A incidência média anual de casos de CBM relatados no Brasil foi de 6,4/ano (71 casos/11 anos) para o estado do Paraná (região sul), 5,9/ano (325 casos/55 anos) para o Pará (região norte), 4,3/ano (13 casos/3 anos) para o Maranhão (região Nordeste) e 2,6/ano (73 casos/28 anos) para o Rio Grande do Sul (LONDERO; RAMOS, 1976; SILVA; DE SOUZA; ROZENTAL, 1998; MINOTTO et al., 2001; QUEIROZ-TELLES et al., 2003, 2009; PIRES et al., 2012). Os principais agentes etiológicos da CBM no Brasil são as espécies de *Fonsecaea* (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

O estado do Maranhão ocupa o terceiro lugar no registro da doença no Brasil e a maioria dos casos ocorre na baixada maranhense, região amazônica do estado. Existem estudos nessa região que relatam casos de CBM associados à atividade de quebra do coco de babaçu, importante ocupação dos moradores da região (MARQUES et al., 2006).

A CBM acomete principalmente indivíduos em idade produtiva, com profissões relacionadas ao manuseio de terra como atividades agrícolas, extrativistas e de construção civil. Com relação ao sexo, o maior acometimento dos homens pode estar associado à atividade profissional. Contudo, Silva e colaboradores (1998) abordam a possibilidade de que os hormônios sexuais femininos exerçam um papel protetor, similar ao que ocorre na

Paracoccidioidomicose, pela baixa porcentagem de casos nas mulheres (SILVA; DE SOUZA; ROZENTAL, 1998; MOUCHALOUAT et al., 2011).

O número de novos casos de CBM está diminuindo em algumas regiões brasileiras, provavelmente como consequência de várias modificações de métodos agrícolas, incluindo o uso maciço de fungicidas agrícolas de azóis e mecanização progressiva da agricultura, resultando em uma diminuição de fatores de risco devidos à exposição ocupacional (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

1.3 AGENTES DA CROMOBLASTOMICOSE: *Fonsecaea* spp.

Os agentes etiológicos da CBM pertencem principalmente aos gêneros *Cladophialophora*, *Phialophora* e *Fonsecaea* (AMEEN, 2010); *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii* são as espécies mais frequentes, comuns em regiões tropicais e subtropicais (AZAD et al., 2011; KIM et al., 2011), embora *F. pedrosoi* predomine em regiões úmidas e *C. carrionii*, em regiões semiáridas (QUEIROZ-TELLES et al., 2009). Outras espécies têm sido associadas com menor frequência a esta micose, como *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquarspersa*, *Exophiala spinifera* e *Exophiala dermatitidis* (PADHYE et al., 1996; QUEIROZ-TELLES et al., 2017) e recentemente foram descritas, *Cyphellophora ludoviensis* e *Rhinocladiella tropicalis* (GOMES et al., 2016). Nas últimas décadas, novas espécies do gênero *Fonsecaea* foram descritas, baseadas em critérios moleculares, são elas *Fonsecaea monophora* (DE HOOG; ATTILI-ANGELIS; VICENTE, 2004), *Fonsecaea nubica* (NAJAFZADEH et al., 2010b), *Fonsecaea multimorphosa* (NAJAFZADEH et al., 2011b) e *Fonsecaea pugnacius* (DE AZEVEDO et al., 2015).

No Brasil, os agentes da CBM mais frequentes pertencem ao gênero *Fonsecaea* (GOMES et al., 2016). *Fonsecaea pedrosoi*, *F. nubica*, *F. monophora* e *F. pugnacius* só se diferenciam entre si por meio de análises genotípicas, já que fenotipicamente são muito semelhantes. *Fonsecaea monophora* e *F. pugnacius* apresentam neurotropismo significativo, levando à disseminação para o cérebro e outros órgãos (SURASH et al., 2005; NAJAFZADEH et al., 2010b; DE AZEVEDO et al., 2015) ou causando infecção primária no cérebro sem lesões cutâneas, que são formas clínicas de feohifomicose, quando não são observadas células muriformes nos tecidos (FADER; MCGINNIS, 1988; SURASH et al., 2005). Sua morfologia em cultivo revela, macroscopicamente, colônias de aspecto aveludado,

anverso com coloração verde oliva a negro e reverso negro. Já microscopicamente, observam-se hifas septadas, ramificadas, de coloração marrom com conidiogênese do “tipo-*Cladosporium*” (Figura 2), “tipo-*Phialophora*” e “tipo-*Rhinocladiella*” (LACAZ et al., 2002).

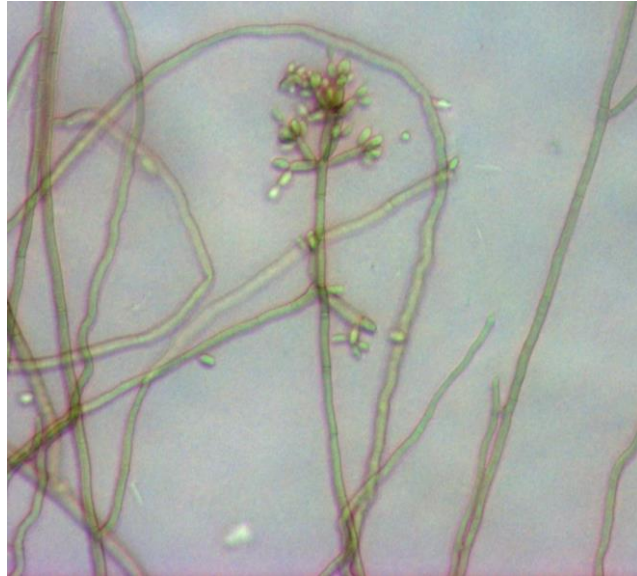


Figura 2: Conidióforos do tipo cladospório de cadeia curta presentes em *Fonsecaea* spp. (aumento de 400x, Microscópio e software Zeiss). Fonte: Rowena A. Coelho / Leonardo S. Barbedo (INI/Fiocruz, 2016).

As espécies patogênicas de *Fonsecaea* apresentam desenvolvimento ótimo a 33°C, com uma termotolerância de crescimento a 37°C. Estas temperaturas cardinais são ligeiramente superiores às de espécies estritamente ambientais (VICENTE et al., 2014). Apresentam aparência filamentosa mediante cultivo a 25, 30 ou 37°C (SANTOS et al., 2007).

Na natureza, os agentes da CBM vivem saprobicamente decompondo a matéria orgânica proveniente de diversos substratos oriundos do solo, restos de vegetais, pedaços de madeira, água contaminada, entre outros (SALGADO et al., 2004). É o contato comumente acidental do homem com o meio ambiente contaminado com esses fungos que contribui para o desencadeamento dessa infecção fúngica. Atividades agrícolas, extrativistas e de construção civil são fatores de risco por ocasião de traumas na pele e inoculação do agente durante o trabalho (LÓPEZ MARTÍNEZ; MÉNDEZ TOVAR, 2007). Dentro do tecido, o fungo converte sua fase filamentosa em estruturas globosas de paredes espessas e acastanhadas. Essas estruturas são arredondadas e se multiplicam por septos ou trabéculas, em um ou dois planos distintos, diante de uma reação inflamatória granulomatosa e purulenta. São denominadas de células escleróticas ou células muriformes que podem ser observadas em exame direto com hidróxido de potássio (KOH) (ZAITZ et al., 2010).

O diagnóstico micológico definitivo da doença consiste na observação de células escleróticas em microscopia óptica, a partir do exame direto do raspado das lesões (Figura 3) ou de cortes histológicos corados obtidos de biópsia. A coleta do material biológico deve ser realizada na área lesional rica em pontos negros. O crescimento dos agentes da CBM em meio de cultura também constitui ferramenta auxiliar no diagnóstico. As colônias suspeitas aparecem depois de 7 a 15 dias de cultivo sob a forma de pequenos pontos pretos, penugentos. Estuda-se, então, o aspecto macroscópico da colônia, bem como a micromorfologia do fungo por meio da cultura em lâmina, sendo possível classificar os agentes em nível de gênero com essas técnicas (AMEEN, 2010).

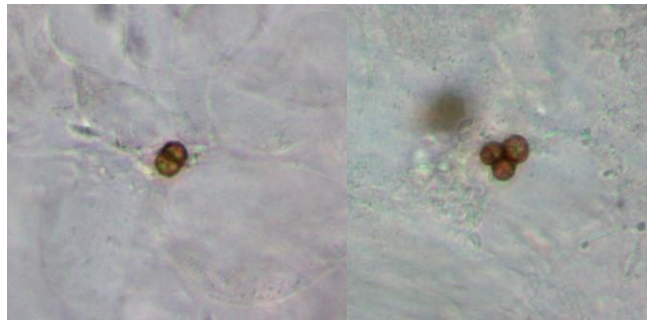


Figura 3: Corpo muriforme (aumento de 400x, microscópio e software Zeiss).
Fonte: Rowena A. Coelho / Leonardo S. Barbedo (INI/Fiocruz, 2016).

1.4 PATOGENIA

Fatores que são significativos para a patogenicidade da CBM são melanina, células muriformes, adesão celular e hidrofobicidade. Os mecanismos imunológicos do hospedeiro contra o agente de CBM, incluindo respostas celulares e humorais, são mal compreendidos. Alguns trabalhos mostraram o significado da resposta celular na interação hospedeiro-fungo, sugerindo que a persistência fúngica *in situ* é o principal fator responsável pela evolução da CBM (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Os fungos melanizados são organismos polimórficos. Devido à sua plasticidade e adaptabilidade a vários ambientes orgânicos e inorgânicos, esses fungos podem mostrar uma grande diversidade na sua morfologia. Acredita-se que as hifas e os conídios sejam encontrados abundantemente na natureza e sejam facilmente replicados em meios simples, como ágar Sabouraud (SALGADO et al., 2004; VICENTE et al., 2014). Em contraste, as formas de resistência geralmente são encontradas apenas em condições extremas de estresse ambiental, como temperaturas muito altas ou muito baixas, pHs extremos e solos com

deficiência de nutrientes. Essas formas de resistência também podem sobreviver nas rochas e nas plantas (HASELWANDTER; EBNER, 1994; GOSTINCAR et al., 2010).

Após a implantação transcutânea, propágulos de agentes de CBM apresentam uma plasticidade celular e morfológica únicas. Durante a infecção, a diferenciação celular torna-se meristemática, com inchaço isodiamétrico e septo cruzado. O termo "célula muriforme" é restrito a células dos *Chaetothyriales* com crescimento meristemático que servem como formas invasivas no tecido vivo, humano ou vegetal (DE HOOG, 1993). As células muriformes podem ser soltas ou agrupadas. Eles têm uma forma redonda a poliédrica em uma parede grossa pigmentada sombreada com paredes transversais e longitudinais. A célula muriforme é considerada um mecanismo de adaptação evolutiva para permitir a sobrevivência dentro do microambiente do hospedeiro (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006). Está diretamente associada a uma intensa resposta granulomatosa, bem como à evasão de mecanismos imunológicos que sinalizam o aparecimento da cronicidade da doença.

O arranjo de células muriformes em tecido representa uma relação superfície/volume ideal favorecendo a deposição significativa de melanina. *Fonsecaea pedrosoi* requer uma baixa concentração (0,1 mM, pH 2,5) de Ca^{2+} para se diferenciar de micélios em células muriformes, indicando que a concentração de íons pode ser importante no processo de transição durante a CBM (MENDOZA; KARUPPAYIL; SZANISZLO, 1993; SEYEDMOUSAVI et al., 2014). Entre outros fatores, a melanina também está fortemente associada ao processo de transição. Além disso, as células muriformes representam uma ferramenta de diagnóstico diferencial significativa para distinguir entre CBM e a feohifomicose, na qual esses elementos não são detectados (SZANISZLO; COOPER; VOGES, 1972). As células muriformes são altamente resistentes ao ataque do sistema imunológico e, portanto, um melhor conhecimento desse processo de diferenciação pode permitir a proposta de abordagens terapêuticas diferentes e mais eficientes contra CBM (HAMZA et al., 2003; SANTOS et al., 2007; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

A adesão microbiana é um dos determinantes mais importantes da patogênese fúngica (DA SILVA et al., 2004; SANTOS et al., 2007). Para CBM, formas infecciosas podem manter-se no tecido epitelial dentro do hospedeiro, levando à diferenciação de células muriformes que resistem à morte pela resposta imune do hospedeiro e permitem a evolução da inflamação granulomatosa crônica. As glicoproteínas da parede celular e os glicolipídeos parecem funcionar como epítomos, indicando seu uso em imunodiagnóstico e terapia potencial focada na estimulação da resposta humoral (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Glicosilceramidas são componentes lipídicos imunologicamente ativos de uma grande variedade de fungos que induzem à produção de anticorpos. Células jovens de *F. pedrosoi* em divisão reconhecem anticorpos monoclonais contra essas ceramidas e a ligação deles com esses componentes da parede celular interfere com a replicação, resultando em diminuição do crescimento fúngico. Macrófagos tratados com esses anticorpos têm a fagocitose aumentada ajudando as células hospedeiras a eliminar o fungo (NIMRICHTER et al., 2004).

A fosforilação de proteínas e a desfosforilação são importantes para a imunomodulação, influenciando a reação do hospedeiro a invasores de patógenos fúngicos (MENDES-GIANNINI et al., 2005; SANTOS et al., 2007). O contato e a invasão de *F. pedrosoi* em células epiteliais e macrófagos podem estar associados à atividade de proteínas quinases fúngicas (LIMONGI; DE SOUZA; ROZENTAL, 2003). Em particular, os inibidores da proteína quinase, como a genisteína e a estaurosporina, quando utilizados para o pré-tratamento de macrófagos ou conídios de *F. pedrosoi* antes da infecção, podem inibir a invasão celular. Notavelmente, o pré-tratamento de conídios teve efeito apenas nas interações com células epiteliais, sem influência sobre os macrófagos (LIMONGI; DE SOUZA; ROZENTAL, 2003). Inibidores específicos de peptidase (IPs) contra o vírus da imunodeficiência humana afetam significativamente a secreção de peptidase e o crescimento de *F. pedrosoi*, interferindo nos contatos celulares do fungo-hospedeiro. A atividade da peptidase foi prejudicada de forma dependente da dose, com o nelfinavir produzindo o maior resultado inibitório. O crescimento de *Fonsecaea pedrosoi* foi consideravelmente afetado após a exposição aos IP, enquanto a estrutura do conídio apresentou alterações morfológicas significativas que incluíam a invaginação do citoplasma, desprendimento da parede celular, ampliação de vacúolos fúngicos e divisão celular anormal (PALMEIRA et al., 2008).

1.5 QUADRO CLÍNICO

A maioria das lesões iniciais da CBM são observadas nos membros inferiores devido ao fato dos trabalhadores rurais frequentemente não usarem sapatos em suas atividades. É importante considerar na evolução da doença fatores como tempo de evolução do quadro, sítio envolvido, hábitos do paciente, comorbidades e adesão ao tratamento. Apesar de as lesões de CBM não se estenderem a outros órgãos, o acometimento do tecido subcutâneo leva a alterações fibróticas importantes com comprometimento da drenagem linfática do segmento

acometido. A ocorrência de infecção bacteriana secundária é frequente e influi negativamente na evolução clínica. Os sintomas podem não ser importantes e não afetar as atividades do paciente. Entretanto, com o passar do tempo e o aumento da lesão, surgem mais queixas, como dor, prurido, edema local e limitação funcional (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

A infecção inicia-se após propágulos infecciosos dos agentes etiológicos obterem entrada através da barreira cutânea, geralmente em áreas expostas e não protegidas do corpo (BONIFAZ; CARRASCO-GERARD; SAUL, 2001; QUEIROZ-TELLES et al., 2009, 2011; LA HOZ; BADDLEY, 2012). O período entre a inoculação e a lesão inicial é incerto e pode variar de semanas a meses; alguns pacientes não relatam nenhuma inoculação. A lesão inicial pode começar como uma lesão macular eritematosa e progride para uma lesão papular rósea e lisa. Com o tempo, pode manifestar-se como uma lesão papuloescamosa e evoluir com aspectos polimórficos, o que pode ser confundido com várias doenças infecciosas e não infecciosas, como por exemplo coccidioidomicose, feohifomicose, esporotricose, tuberculose verrucosa, carcinoma de células escamosas, psoríase, pé de musgo, entre outras. A lesão inicial pode se espalhar localmente e produzir lesões satélites. Neste ponto, o prurido é a principal manifestação clínica. Nesta fase inicial, o paciente na maioria das vezes não busca ajuda médica. Este estágio raramente é visto pelo clínico e, se não for diagnosticado, as lesões iniciais podem progredir, assumindo vários tipos de formas clínicas com diferentes graus de gravidade (MCGINNIS, 1983; QUEIROZ-TELLES; SANTOS, 2012; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

As lesões podem ser classificadas de acordo com sua gravidade: forma leve, que envolve uma placa ou nódulo único medindo menos de 5cm de diâmetro; forma moderada, que consiste em lesões únicas nodulares ou verrucosas, ou múltiplas, formando ou não placas, que abrangem uma ou duas regiões cutâneas adjacentes e medem menos de 15cm de diâmetro; forma grave, que inclui qualquer tipo de lesão (nodular, verrucosa, tumoral ou cicatricial) sozinha ou em combinação, abrangendo regiões cutâneas extensas, adjacentes ou não. Essas lesões graves tendem a evoluir lentamente ou não responder ao tratamento com antifúngicos (QUEIROZ-TELLES et al., 2003, 2009, 2017).

Menos frequentemente, a CBM tem sido observada em hospedeiros imunossuprimidos, geralmente em receptores transplantados de órgãos sólidos e em associação com doenças neoplásicas (DUPONT et al., 2010; CLEINMAN et al., 2017). Associações de CBM com várias doenças infecciosas são reportadas, incluindo osteomielite, paracoccidioidomicose, leishmaniose, tuberculose e hanseníase (SILVA et al., 1994;

MINOTTO et al., 2001; SLESÁK et al., 2011; SOLÓRZANO; GARCÍA; HERNÁNDEZ-CÓRDOVA, 2011; SHI et al., 2016). Essas coinfeções podem aumentar a progressão de ambas as doenças, resultando em terapia antifúngica prolongada e aumento da toxicidade devido a esse tipo de terapia. Em casos avançados são observados linfedema crônico, anquilose e transformação maligna. A última é a complicação associada à CBM mais agressiva e incapacitante, que leva principalmente ao carcinoma de células escamosas (OGAWA et al., 2003; QUEIROZ-TELLES et al., 2009; JAMIL; LEE; THEVARAJAH, 2012; QUEIROZ-TELLES; DE C L SANTOS, 2013; AZEVEDO et al., 2015; ROJAS et al., 2015). De acordo com a literatura, é difícil estabelecer se a associação de CBM, inflamação crônica e infecção bacteriana podem desempenhar um papel como fator cancerígeno ou cocarcinogênico (AZEVEDO et al., 2015).

1.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Fonsecaea* spp.

Para identificação de espécies dos agentes de CBM é recomendada a caracterização molecular pelo sequenciamento da região do espaço transcrito interno (ITS) do ADN ribossomal (rADN). Diferenças interespecíficas na sequência do ITS1 e ITS2 tem sido utilizadas para detectar e identificar espécies de fungos (ABLIZ et al., 2003). Além disso, estudos taxonômicos podem aplicar genes específicos, como aqueles que codificam o gene do ciclo parcial da divisão celular (*cdc42*), a β -tubulina (*BT2*), o fator de alongamento da tradução 1- α (*TEF-1 α*) e o gene da actina (*ACT1*), entre outros (NAJAFZADEH et al., 2010b, 2011b; SUN et al., 2012; BADALI et al., 2013; DE AZEVEDO et al., 2015). Essas sequências podem ser obtidas por AFLP (*Amplified fragment-length polymorphism*) (NAJAFZADEH et al., 2011b) ou RFLP (*Restriction fragment-length polymorphism*) (ATTILI; DE HOOG; PIZZIRANI-KLEINER, 1998) como uma abordagem filogenética para avaliar a delimitação das espécies. Também podem ser utilizadas análises de LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*), técnica que pode ser empregada no diagnóstico clínico rápido, detecção ambiental e estudos retrospectivos em amostras clínicas arquivadas (SUN et al., 2010) ou ainda, por RCA (*Rolling circle amplification*) que consiste em um ensaio rápido e sensível para a identificação de fungos patogênicos sem sequenciamento (NAJAFZADEH et al., 2011a).

1.7 PRODUÇÃO DE MELANINA POR *Fonsecaea* spp.

Os fungos melanizados também são denominados fungos "dematiáceos", "phaeóides" ou simplesmente "pretos" (AJELLO et al., 1974; FADER; MCGINNIS, 1988; REVANKAR; SUTTON, 2010). Esta denominação refere-se a fungos contendo grande quantidade de um pigmento chamado melanina nas suas paredes celulares. A melanina é uma macromolécula complexa, hidrofóbica, carregada negativamente, que inclui polímeros indólicos ou fenólicos (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; REVANKAR; SUTTON, 2010).

Diversos fungos patogênicos como, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp., *E. dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Candida albicans* produzem melanina, que se apresenta como importante fator de virulência durante o processo de infecção do hospedeiro (JACOBSON, 2000; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; ALMEIDA-PAES et al., 2012). Considera-se que a melanina desempenha um papel importante, embora outros compostos como peptidases, glicosíngolípídeos e sialidase também estejam envolvidos na patogênese (SANTOS et al., 2007).

Fonsecaea spp. produz e secreta melanina constitutivamente, que age como um sequestrador de radicais oxidativos do oxigênio tornando estes fungos mais resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro e proporciona resistência e integridade à parede celular frente a diversos compostos químicos, como os fármacos antifúngicos, apresentando-se como importante fator de virulência (ROZENTAL; ALVIANO; DE SOUZA, 1994, 1996).

A melanina interfere com a ativação do complemento, reduzindo a susceptibilidade de fungos melanizados aos agentes antifúngicos. Esse pigmento tem um efeito protetor pela interação direta com o óxido nítrico (NO). Atua como uma armadilha para o elétron não irradiado de NO, protegendo o fungo contra danos oxidativos. Este mecanismo não permite que macrófagos ou outros fagócitos eliminem os elementos fúngicos e podem explicar em parte o curso recalcitrante e crônico da CBM (ALVIANO et al., 2004; TORRES-GUERRERO et al., 2012).

Em *Fonsecaea* spp., a síntese de melanina ocorre por meio da via do dihidroxinaftaleno (DHN), em organelas denominadas melanossomos (CUNHA et al., 2005, 2010). A melanina derivada de DHN é constitutivamente sintetizada através de policetídeos, em uma via que começa com acetil coenzima A (Figura 4) (FRANZEN et al., 2008).

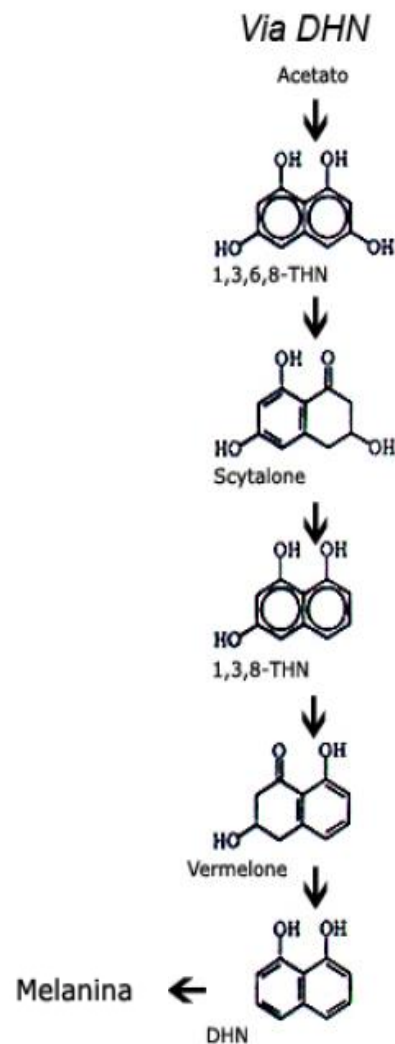


Figura 4: Esquema da via DHN de produção de melanina em fungos. Adaptado de (KAJISHIMA, 2009).

O triciclazol (5-metil-1,2,4-triazol[3,4]benzotiazol) é um agrotóxico, comercialmente conhecido como BIM 750 (Dow Agrosiences, EUA). O alvo específico deste composto está na via DHN de biossíntese da melanina, tendo pouco ou nenhum efeito inibidor no crescimento do fungo em cultura (ROMERO-MARTINEZ et al., 2000; BUTLER; GARDINER; DAY, 2005; CUNHA et al., 2005; FRANZEN et al., 2006).

A inibição deste processo bioquímico específico com triciclazol pode ser utilizada para induzir alterações morfológicas na parede celular de *F. pedrosoi*, conduzindo a uma resistência diminuída do fungo à lise mecânica e à morte por ação de macrófagos (CUNHA et al., 2005; FRANZEN et al., 2006).

Foram propostos três mecanismos possíveis associados à contribuição da melanina para a resistência aumentada de fungos contra células do sistema imune do hospedeiro:

proteção contra enzimas proteolíticas, proteção contra danos oxidativos e redução da fagocitose (FRANZEN et al., 2008; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

1.8 TRATAMENTO

A terapia da CBM é longa e está associada a baixas taxas de cura e altas taxas de recaída, particularmente em doença crônica e extensa. *F. pedrosoi* mostra-se menos susceptível às terapias antifúngicas quando comparado com *C. carrionii* ou *P. verrucosa*. Além disso, não existe um padrão de tratamento a seguir, sendo necessário administrar mais de um fármaco e fazer uso de métodos físicos na maioria dos casos (AMEEN, 2009).

Para o sucesso no tratamento dos pacientes com CBM, é importante considerar a saúde geral do paciente, sua condição socioeconômica, bem como sua aderência à terapia, controle da resistência ao fármaco e tratamento de comorbidades e complicações, pois nenhum dos tratamentos disponíveis produz resultados inteiramente satisfatórios em todos os casos. Isso se dá, em parte, devido à diversidade do agente etiológico, alguns dos quais podem não ser susceptíveis aos fármacos usados e, também, devido à natureza das lesões hiperkeratóticas e nodulares que dificultam a penetração dos fármacos no tecido onde o fungo está localizado. O fator mais importante, contudo, é a demora em iniciar o tratamento dos pacientes, pois a maioria são trabalhadores rurais em locais distantes do atendimento médico que não podem arcar com os altos custos e a longa duração do tratamento ou não podem se ausentar para o mesmo por muito tempo, pois o sustento da família depende de sua força de trabalho (LÓPEZ MARTÍNEZ; MÉNDEZ TOVAR, 2007).

Existem várias formas de tratamento relatadas na literatura, incluindo os métodos físicos como a terapia fotodinâmica, laserterapia, terapia pelo calor, criocirurgia ou intervenções cirúrgicas para pequenas lesões e a terapia antifúngica farmacológica (TORRES-GUERRERO et al., 2012). A terapia fotodinâmica é uma modalidade terapêutica que combina fótons de luz visível de um comprimento de onda apropriado para estimular moléculas intracelulares de um fotossensibilizador, que produz várias moléculas reativas, incluindo espécies de oxigênio, o que leva ao dano da célula alvo (LYON et al., 2011, 2013). A laserterapia mais aplicada no tratamento da CBM envolve o uso de um laser de dióxido de carbono (CO₂) com potência de onda contínua muito alta, promovendo a fotocoagulação. Com sua alta precisão, danos mínimos nos tecidos e capacidades hemostáticas, o laser de CO₂

é um laser ablativo não seletivo ideal e muito útil. Os lasers podem ser aplicados em combinação com outras modalidades de tratamento (KUTTNER; SIEGLE, 1986; HIRA et al., 2002; TSIANAKAS et al., 2008). A terapia de calor é uma opção que merece mais investigação clínica. A temperatura máxima de crescimento de patógenos causadores de CBM é de 42 a 46°C e, portanto, a aplicação de terapia de calor, seja em terapia combinada ou em monoterapia, produz resultados favoráveis (TAGAMI, 1979; TAGAMI et al., 1984). A criocirurgia usa nitrogênio líquido, o agente criogênico mais frio (-196°C) e com a maior capacidade de congelamento, para estimular reações inflamatórias e necrose do tecido afetado. A criocirurgia, assim como a cirurgia, são recomendadas para lesões cutâneas iniciais pequenas e bem delimitadas. Para evitar a disseminação de lesões para áreas adjacentes após esses procedimentos, fármacos antifúngicos devem ser administrados em combinação com métodos físicos (NOBRE et al., 1980; BONIFAZ et al., 1997; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Itraconazol e terbinafina são os fármacos mais usados no tratamento da CBM. Doses de itraconazol, para adultos e adolescentes, de 200 a 400 mg por dia são geralmente recomendadas. A duração do tratamento varia, entretanto, a maioria dos casos apresenta melhora dentro de 8 a 10 meses (QUEIROZ-TELLES et al., 1992). Em geral, a terbinafina apresenta boa atividade *in vitro* contra a maioria dos agentes etiológicos da CBM. As doses recomendadas são de 250 a 500 mg por dia, até que a cura micológica ou a resolução das lesões cutâneas seja alcançada (ESTERRE et al., 1996; ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006; SILVA-ROCHA et al., 2013). Outros fármacos empregados no tratamento incluem a anfotericina B venosa e a flucitosina, porém para administração do primeiro, é necessária a internação do paciente, além disso deve-se considerar o efeito nefrotóxico desse fármaco e suas reações adversas, o que dificulta o tratamento (SAWAYA; BRIGGS; SCHNERMANN, 1995). O segundo fármaco não possui registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e não é comercializado no mercado brasileiro (YAMAUTI et al., 2017).

A combinação de fármacos antifúngicos e métodos físicos costuma ser a última opção de terapia para apresentações clínicas avançadas ou recidiva da doença. A associação de dois fármacos antifúngicos tem mostrado alguns resultados satisfatórios. Na literatura temos uso da associação de terbinafina com itraconazol (LI; WAN; LI, 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017), flucitosina e anfotericina B (POIRRIEZ et al., 2000), flucitosina e itraconazol (ANTONELLO et al., 2010), que podem ser utilizadas em pacientes apresentando doença refratária.

1.9 FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

Para o controle de diversas doenças fúngicas existe um reduzido número de fármacos antifúngicos disponíveis na prática clínica, principalmente se compararmos ao número de antibacterianos utilizados. Anfotericina B, fluconazol e itraconazol são considerados os fármacos essenciais para tratamento de infecções fúngicas invasivas nos hospitais públicos do nosso país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A anfotericina B é um fármaco da classe dos poliênicos, que se liga a uma porção esterol, basicamente ergosterol, presente na membrana de fungos sensíveis, formando poros ou canais (Figura 5). O resultado é um aumento na permeabilidade da membrana que permite o extravasamento de diversas pequenas moléculas, levando à morte celular (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004). Em menor escala, a anfotericina B liga-se também ao colesterol da membrana das células humanas, alterando-as e provocando efeitos adversos. O uso clínico da anfotericina B é limitado pelos efeitos adversos e necessidade de aplicação endovenosa. Portanto, esse fármaco é mais empregado em casos de infecções fúngicas invasivas, particularmente em imunossuprimidos, na doença disseminada em imunocompetentes e em situações especiais, como infecções do sistema nervoso central ou na ausência de outro fármaco eficaz. Constituem indicações primárias de terapia com anfotericina B casos de criptococose, aspergilose, infecções disseminadas por *Candida* spp. resistente a triazólicos e infecções por certos agentes de feohifomicose e de hialohifomicose (MARTINEZ, 2006).

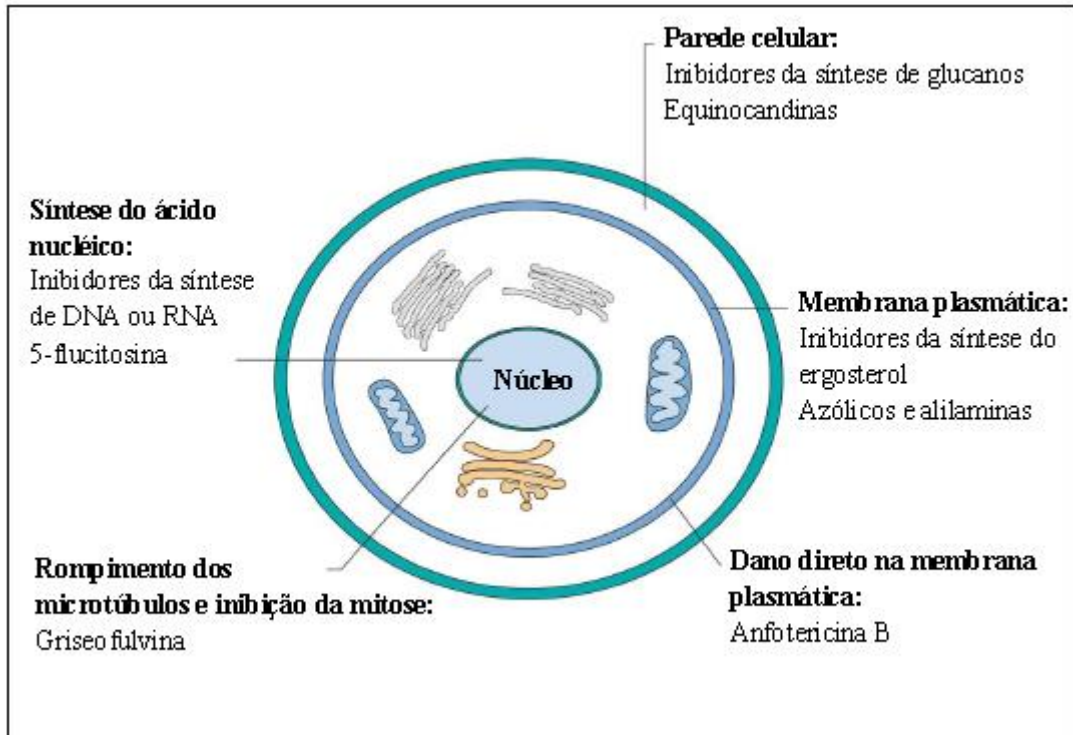


Figura 5: Mecanismo de ação dos principais fármacos antifúngicos atuais com seus respectivos alvos moleculares na célula fúngica. Fonte: MARQUES, F.J. DE F., 2013.

Os compostos azólicos atuam sobre enzimas do citocromo P450 dos fungos, bloqueando a desmetilação do lanosterol e a síntese de ergosterol, o que altera a permeabilidade da membrana e a viabilidade fúngica (Figura 5). São divididos em imidazólicos e triazólicos, e principalmente os imidazólicos, exercem ação apenas fungistática (MARTINEZ, 2006). Os primeiros foram a primeira geração de inibidores da biossíntese do ergosterol presente na membrana celular dos fungos, descobertos no final dos anos 60. Fazem parte desse grupo os fármacos cetoconazol, miconazol, clotrimazol, fenticonazol, entre outros. Nos anos 80, surgiram os triazóis, fluconazol e itraconazol, e os novos derivados dos triazólicos, o voriconazol, o ravuconazol e o posaconazol nas últimas décadas (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006; PEYTON; GALLAGHER; HASHEMZADEH, 2015).

Desde 2013, a Agência Americana de Medicamentos e Alimentos (FDA), a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e a Anvisa contraídicam o uso do cetoconazol oral para o tratamento das micoses cutâneas. A EMA considerou que, embora as lesões hepáticas sejam um efeito colateral conhecido dos medicamentos antifúngicos, a incidência e a gravidade das lesões hepáticas com cetoconazol oral foram superiores aos outros antifúngicos (ANVISA, 2013b; EMA, 2013).

O espectro de ação dos azólicos abrange os agentes de micoses sistêmicas e dermatomicoses. A maioria das espécies de *Candida* mostra susceptibilidade aos azólicos. O itraconazol atua adicionalmente contra *Aspergillus fumigatus* e diversas outras espécies desse gênero, sendo uma alternativa à anfotericina B no tratamento de pacientes com aspergilose, além de ser o principal recurso na terapia antifúngica de pacientes com micoses sistêmicas endêmicas ou com esporotricose. O fluconazol mostra boa atuação e é preferido no tratamento de pacientes com infecções por espécies sensíveis de *Candida*, além de ser utilizado na criptococose e nas infecções urinárias e do sistema nervoso central por fungos susceptíveis. O voriconazol e o posaconazol são triazólicos de segunda geração e representam avanços na terapêutica das infecções fúngicas por terem o espectro de ação ampliado. Entretanto, uma limitação para o uso desses fármacos, particularmente em países em desenvolvimento, é o alto custo (PASQUALOTTO; THIELE; GOLDANI, 2010). Isavuconazol, ravuconazol e albaconazol são triazólicos de espectro estendido que demonstram ser promissores no tratamento de infecções fúngicas. O ravuconazol está sendo desenvolvido como seu pró-fármaco, fosravuconazol bis (L-lisina), para o tratamento de infecções fúngicas, eumicetoma e doença de Chagas (PEYTON; GALLAGHER; HASHEMZADEH, 2015).

Um outro agente antifúngico sistêmico utilizado é o pró-fármaco flucitosina, que pertence à classe das pirimidinas. Todos os fungos sensíveis são capazes de desaminar a flucitosina em 5-fluorouracila, um potente antimetabólito; como resultado final, a síntese de ácido desoxirribonucleico (ADN) dos mesmos fica prejudicada (Figura 5). A flucitosina tem espectro de ação restrito, com atividade clinicamente útil contra *C. neoformans*, *Candida* spp. e os agentes da CBM, e a resistência farmacológica que surge durante a terapia é causa importante de fracasso terapêutico (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; BRUNTON; BRUNTON; CHABNER, 2012; LEMKE et al., 2017).

A terbinafina pertence à classe das alilaminas e inibe a enzima esqualeno epoxidase. Essa enzima é crítica na produção do ergosterol, principal esterol susceptível da célula fúngica. Ocorre a diminuição da síntese do ergosterol e o aumento do esqualeno na membrana celular, que leva à lise da célula fúngica (Figura 5) (GUERRA et al., 2012).

As equinocandinas pertencem à classe das candinas, que atuam na formação da parede celular do fungo, inibindo a enzima ligada à síntese de beta (1,3) D glucana (Figura 5) (DERESINSKI; STEVENS, 2003) e agem *in vitro* sobre diversas leveduras e fungos filamentosos. Entretanto, em infecções experimentais é relevante somente a sua atividade fungicida nas espécies de *Candida* e de *Saccharomyces*, apresentando efeito fungistático

sobre espécies de *Aspergillus* (PATIL; MAJUMDAR, 2017). A caspofungina foi o primeiro fármaco desta classe a receber aprovação comercial do *Food and Drug Administration* (FDA, 2001). Estão disponíveis no mercado, além da caspofungina, outras duas equinocandinas com indicações clínicas, a micafungina e a anidulafungina. Os eventos adversos são menos frequentes do que com a anfotericina B e a interação com outros fármacos é menor do que com os azólicos. Contudo, a administração exclusivamente endovenosa e o restrito espectro de ação limitam o uso clínico das equinocandinas a infecções mais graves por *Candida* e *Aspergillus* (MARTINEZ, 2006; PATIL; MAJUMDAR, 2017).

2 RELEVÂNCIA

O Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), é um centro de referência na pesquisa e atendimento de pacientes com diversas doenças infecciosas, dentre elas as micoses profundas que fazem parte do rol das doenças negligenciadas. Por essas características, é um local ímpar para observação, análise e compartilhamento de conhecimentos clínico-laboratoriais acerca dessas doenças.

Várias espécies de fungos demáceos causam a CBM. Nos últimos anos, têm sido descritas, por estudos de biologia molecular, novas espécies relacionadas àquelas tradicionalmente conhecidas como agentes de CBM. Segundo a literatura, algumas espécies estão associadas a casos mais graves e invasivos (DE AZEVEDO et al., 2015). Por este motivo, é importante, além da identificação fenotípica, a caracterização molecular a fim de evidenciar a prevalência das espécies isoladas na nossa região, bem como verificar se ocorre variação no perfil de susceptibilidade antifúngica de acordo com a espécie isolada.

O tratamento da CBM, em geral, é longo e sujeito a recaídas, e, na maioria dos casos, ocorre o aparecimento de formas crônicas altamente resistentes à terapia. Várias formas de intervenção são relatadas na literatura, no entanto não existe uma padronização do tratamento da CBM. Por este motivo, a avaliação *in vitro* da susceptibilidade a estes agentes antifúngicos pode ser uma forma de orientar o tratamento desta micose.

Em 2002, foi criada a norma de referência M38-A para o estudo da susceptibilidade *in vitro* de fungos filamentosos aos fármacos antifúngicos, que seis anos mais tarde foi atualizada para uma nova versão, M38-A2 (CLSI, 2008). Atualmente, não existe padronização e pontos de corte definidos para a determinação da susceptibilidade *in vitro* de fungos melanizados (REVANKAR; SUTTON, 2010). Existem poucos dados disponíveis na literatura e a determinação dos perfis de susceptibilidade é de grande interesse para os casos em que os pacientes não apresentam melhora satisfatória com o tratamento.

Fonsecaea spp. apresentam colônias pigmentadas devido à produção de melanina, que é um importante fator de virulência em vários fungos patogênicos, protegendo-os do sistema imune do hospedeiro e de fármacos antifúngicos. Sendo assim, torna-se relevante a investigação do papel da produção de melanina na proteção contra os fármacos antifúngicos, a fim de avaliar se a inibição da via DHN seria uma forma de alcançar uma resposta terapêutica mais eficaz nos pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o perfil de susceptibilidade aos fármacos antifúngicos de isolados de *Fonsecaea* spp. obtidos de pacientes com cromoblastomicose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar molecularmente as espécies;
- Avaliar a susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos e identificar possíveis combinações de fármacos com sinergismo contra os isolados de *Fonsecaea* spp.;
- Investigar a influência da melanina fúngica na susceptibilidade dos isolados;
- Estudar a existência de associação entre susceptibilidade aos fármacos *in vitro* dos isolados e dados clínicos dos pacientes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 APROVAÇÃO ÉTICA

Este estudo foi avaliado e sua condução aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INI/Fiocruz, sob o número CAAE: 52247016.0.0000.5262.

4.2 ISOLADOS CLÍNICOS E PACIENTES

O estudo incluiu 20 isolados de fungos demáceos obtidos de 17 pacientes com CBM. Os isolados obtidos das lesões desses pacientes foram armazenados de 1999 a 2015 no Laboratório de Micologia do INI e identificados fenotipicamente como *Fonsecaea pedrosoi*. De um total de 17 pacientes, doze foram tratados no ambulatório do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatologia Infeciosa do INI, Fiocruz, sendo sete destes previamente estudados clinicamente por Mouchalouat e colaboradores (2011), e os 5 restantes foram acompanhados em outras instituições, após a confirmação do diagnóstico micológico no INI. Todos os pacientes apresentaram células muriformes, características de CBM, em amostras histológicas ou micológicas. Para os pacientes acompanhados no INI, as lesões foram classificadas de acordo com a localização, variedade clínica (nodular, tumoral, verrucosa, placa e cicatricial) e intensidade (leve, moderada ou grave). A forma leve foi definida como uma placa única ou lesão nodular <5 cm de diâmetro; a forma moderada, como lesões simples ou múltiplas nodulares, verrucosas ou em placa ≥ 5 cm e <15 cm em uma ou duas áreas de pele adjacentes e, a forma grave, como lesões extensas envolvendo áreas de pele adjacentes ou não adjacentes, incluindo os tipos tumoral e cicatricial. Itraconazol 200-400mg por dia foi o fármaco de escolha, e fluconazol ou terbinafina foram possíveis fármacos adjuvantes em casos de resposta insatisfatória. Outras terapias adjuvantes incluíram remoção cirúrgica e criocirurgia com nitrogênio líquido em spray. As seguintes variáveis de interesse foram obtidas nos prontuários dos pacientes: idade, sexo, ocupação, cidade de residência, estado de nascimento, fonte provável de transmissão, duração dos sinais e sintomas até a admissão, forma clínica, gravidade da doença na admissão, comorbidades, tratamento, desfecho. As variáveis foram armazenadas em banco de dados sem identificação dos pacientes.

4.3 REISOLAMENTO

Todos os isolados foram semeados no meio ágar batata dextrose (PDA) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Índia) em placas de Petri (90 mm) para avaliar a viabilidade, pureza e para obtenção de colônias isoladas. Todas as placas foram incubadas a 30°C por sete dias. Foi realizado o exame macroscópico das colônias e a técnica de microcultivo para observação das estruturas fúngicas (Figura 6).

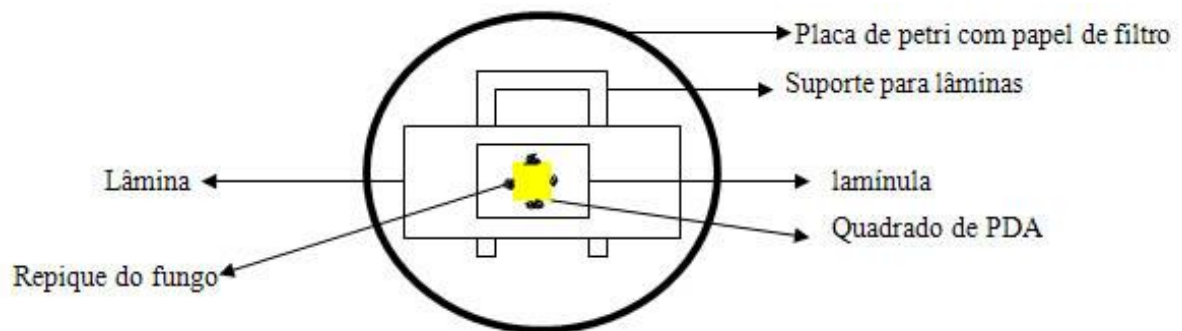


Figura 6: Técnica de microcultivo para análise microscópica de fungos filamentosos (ANVISA, 2013a).

O microcultivo foi realizado colocando um cubo de PDA sobre uma lâmina esterilizada, contida em uma placa de Petri estéril. A lâmina foi colocada sobre um suporte, formado por um pequeno bastão de vidro recurvado. O fungo foi semeado, a partir de um repique de sete dias, nos quatro lados do cubo de ágar e foi recoberto com uma lamínula esterilizada. Foi realizado em uma câmara úmida, adicionando 1 a 2 mL de água destilada estéril no fundo da placa, para evitar a dessecação do meio de cultura, durante o crescimento do fungo. A placa foi tampada e incubada a 30°C por sete dias. Após esse período, retirou-se a lamínula com auxílio de uma pinça, cuidadosamente, e pingou-se uma gota de lactofenol na face da lamínula que estava em contato com o meio de cultivo e esta foi colocada sobre uma lâmina. Desprezou-se o cubo de ágar e, em seu lugar, pingou-se outra gota do corante e recobriu-se com nova lamínula, para visualizar conídios e hifas também aderidos à lâmina. As lâminas prontas foram observadas em microscópio óptico Zeiss Axiolab com objetiva de 40 X, avaliando o tipo e cor da hifa, forma, disposição dos conidióforos e conídios (ANVISA, 2013a).

4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

4.4.1 EXTRAÇÃO DO ADN

A extração de ADN foi realizada segundo Ferrer e colaboradores (2001) com algumas modificações (FERRER et al., 2001). Para isso, foi realizado um repique de cada isolado em placas de Petri (90 mm) contendo meio PDA (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Índia) e incubado a 30°C durante sete dias para obtenção de massa celular. Após essa etapa, a massa do isolado foi macerada com o auxílio de gral e pistilo em nitrogênio líquido. O produto resultante desse processo foi transferido para um tubo de microcentrifuga estéril e, em seguida, foram adicionados 500 µL de tampão de lise (SDS 0,5%, NaCl 1,4%, EDTA 0,73% e Tris-HCl 1M) e 5 µL de β-mercaptoetanol e agitou-se vigorosamente no vórtex por cerca de um minuto. A amostra foi incubada a 65°C por 1 hora, sendo agitada a cada 30 minutos. Logo em seguida, foram adicionados 500 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (v:v:v 25:24:1). Agitou-se vigorosamente no vórtex a fim de obter uma suspensão homogênea e em seguida foi centrifugado a 18440 g (14000 rpm) por 15 minutos. Removeu-se o sobrenadante (cerca de 400 µL) com a micropipeta e o mesmo foi colocado em novo tubo de microcentrifuga. Foi adicionado um volume igual de isopropanol e homogeneizou-se levemente. O ADN foi precipitado a -20°C *overnight*. Centrifugou-se o mesmo a 4°C, 18440 g por 15 minutos. Foi retirada toda a fase líquida com o auxílio da micropipeta. O precipitado foi lavado com etanol 70% (500 µL) e posteriormente centrifugado a 18440 g por 15 minutos. Toda a fase líquida foi retirada com a micropipeta, o precipitado foi obtido e ressuspensão em 100 µL de água livre de DNase. Após essa etapa, o ADN foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoVue Plus™ (GE Healthcare).

4.4.2 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO ADN RIBOSSOMAL (rADN)

Cada isolado foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando um par de *primer* específico para ITS1-5.8S-ITS2 (Tabela 1) e foi realizada utilizando-se 50 µL (volume final) de mistura da reação. Cada reação continha 100 ng do ADN, 1X tampão da PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂; Invitrogen™, Brasil), 0,2 mM

de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP; Invitrogen™ Carlsbad, CA, EUA), 2,5 U de *Taq* ADN polimerase recombinante (Invitrogen™, Brasil), e 10 pmol de cada *primer*. A PCR foi realizada em um termociclador Bio Rad (modelo C 1000) com uma desnaturação inicial por 4 minutos a 95°C; seguido por 35 ciclos com 45 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de pareamento a 52°C e extensão de 2 minutos a 72°C; seguido de uma extensão final de 7 minutos a 72°C (DE AZEVEDO et al., 2015).

Tabela 1: Lista dos *primers* usados para amplificação e sequenciamento (NAJAFZADEH et al., 2009).

locus	<i>Primer</i>	Sequência (5' - >3')
ITS	ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Após a adição de *loading buffer*, na concentração de 1µL de corante para cada 5 µL de produto amplificado, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X, adicionado de 5 µL de brometo de etídio (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA), a 90 V durante 80 minutos. Em seguida, o gel foi visualizado sob a luz ultravioleta de um transiluminador (HOEFER®, MacroVue UV-20).

Sendo observada amplificação na eletroforese descrita acima, o produto da PCR foi purificado com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, EUA) de acordo com instruções do fabricante e foi enviado à Plataforma de Sequenciamento Genômico PDTIS/ Fiocruz, utilizando o sequenciador ABI-3730 (Applied Biosystems). As sequências foram editadas usando o programa *Sequencher* versão 4.9 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EUA), alinhadas e analisadas com o programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013). Por fim, as sequências foram comparadas com as depositadas no banco de dados do NCBI/ *GenBank* e do ISHAM-ITS (IRINYI et al., 2015).

A identificação foi considerada correta quando apresentou mais de 98,5% de identidade quando comparada às sequências do banco de dados ISHAM-ITS (Figura 7). Segundo esse mesmo estudo, o sequenciamento da região ITS é suficiente para identificação das espécies de *Fonsecaea* (IRINYI et al., 2015).

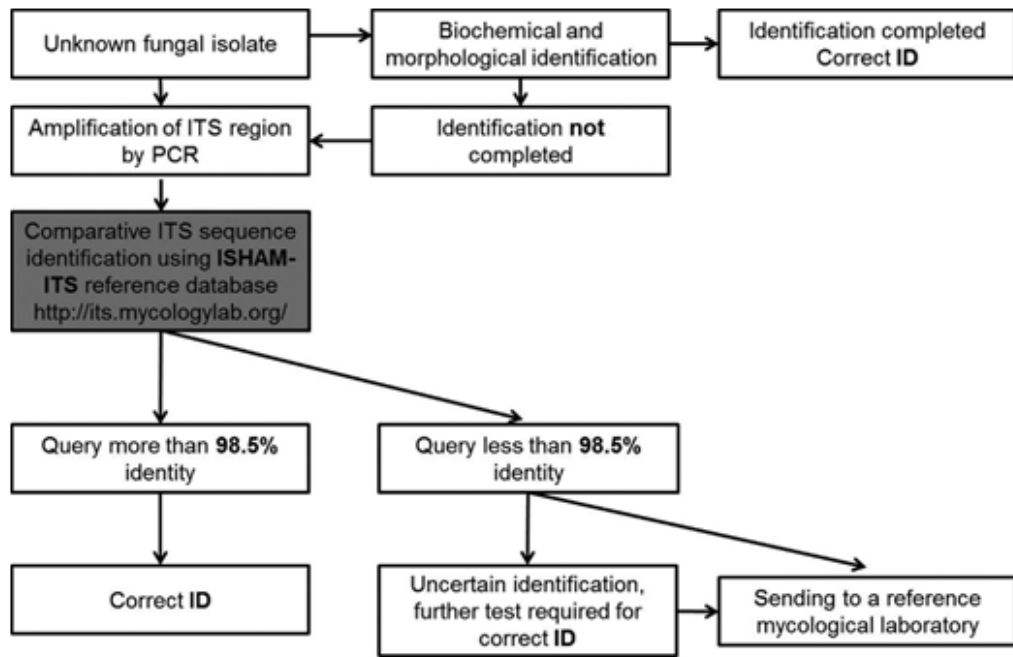


Figura 7: Fluxo de trabalho proposto para identificar fungos patogênicos humanos e animais. Fonte: IRINY et. al., 2015.

4.5 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* AOS ANTIFÚNGICOS

4.5.1 ANTIFÚNGICOS ISOLADOS

Todos os isolados deste estudo foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo de acordo com o documento de referência preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) M38-A2 (CLSI, 2008) com algumas modificações. Os fármacos testados foram anfotericina B (AMB), fluconazol (FLZ), cetoconazol (CTZ), itraconazol (ITZ), voriconazol (VRZ), posaconazol (PSZ), ravuconazol (RVZ), flucitosina (5-FC), terbinafina (TRB), caspofungina (CAS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e micafungina (MFG) (Astellas Pharma Tech Corporation, Takaoka city, Toyama, Japão). Os testes foram realizados em duplicata, em dias diferentes, e quando houve discrepâncias, foram repetidos mais uma vez. As cepas de referência *Aspergillus flavus* (ATCC 204304) e *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305) foram utilizadas como controle interno de qualidade em cada ensaio. Para os fármacos 5-FC, FLZ, CTZ, CAS e MFG, os quais não possuem valores de referência para *Aspergillus*, foram utilizadas as cepas de referência *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019).

As soluções estoque dos antifúngicos AMB, ITZ, CTZ, PSZ, TRB, VRZ e RVZ foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec Química Fina Ltda, RJ, Brasil) na concentração de 1600 µg/mL; a de FLZ e 5-FC foram preparadas em água destilada estéril, na concentração de 5120 µg/mL, e a de CAS e MFG também, em água destilada estéril, na concentração de 1600 µg/mL. Após o preparo, estas soluções foram esterilizadas por filtração com membrana de poro 0,22 µm e estocadas a -20°C em frascos de polipropileno estéreis por até três meses.

Foi utilizado o meio RPMI-1640 em pó com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA), 10,4 g/L tamponado com 0,165 M de MOPS – ácido [morfolino] propanossulfônico P. A. (Vetec Química Fina Ltda, RJ, Brasil), o pH foi ajustado a 7,0 e esterilizado por filtração, com membrana de poro 0,22 µm.

Cada antifúngico foi avaliado em dez diferentes concentrações seriadas. Para AMB, CTZ, ITZ, VRZ, PSZ, RVZ, TRB, CAS e MFG a faixa de concentração foi de 0,0313 a 16 µg/mL. Para FLZ e 5-FC foi de 0,125 a 64 µg/mL. Para os antifúngicos insolúveis em água (AMB, CTZ, PSZ, TRB, VRZ, RVZ e ITZ), o DMSO foi utilizado como diluente no preparo da primeira série de diluições e o RPMI-1640 na segunda. A partir das soluções estoque (1600

$\mu\text{g/mL}$) desses fármacos foi preparada uma série de diluições em base 2 do antifúngico, sendo a primeira equivalente a 100X a concentração final. A seguir, cada solução não aquosa foi diluída 1:100, produzindo uma concentração de antifúngico 2X superior à concentração final do ensaio (Figura 8). Para os antifúngicos solúveis em água (FLZ, 5-FC, CAS e MFG), o diluente empregado em todas as diluições foi o RPMI-1640. Neste caso, a partir da solução estoque (5120 $\mu\text{g/mL}$, FLZ e 5-FC / 1600 $\mu\text{g/mL}$, CAS e MFG) foi preparada uma série de 10 diluições cuja concentração foi 10X mais elevada do que a concentração final. Em seguida, foi realizada uma diluição 1:10 obtendo uma concentração 2X superior à concentração final do ensaio (Figura 9).

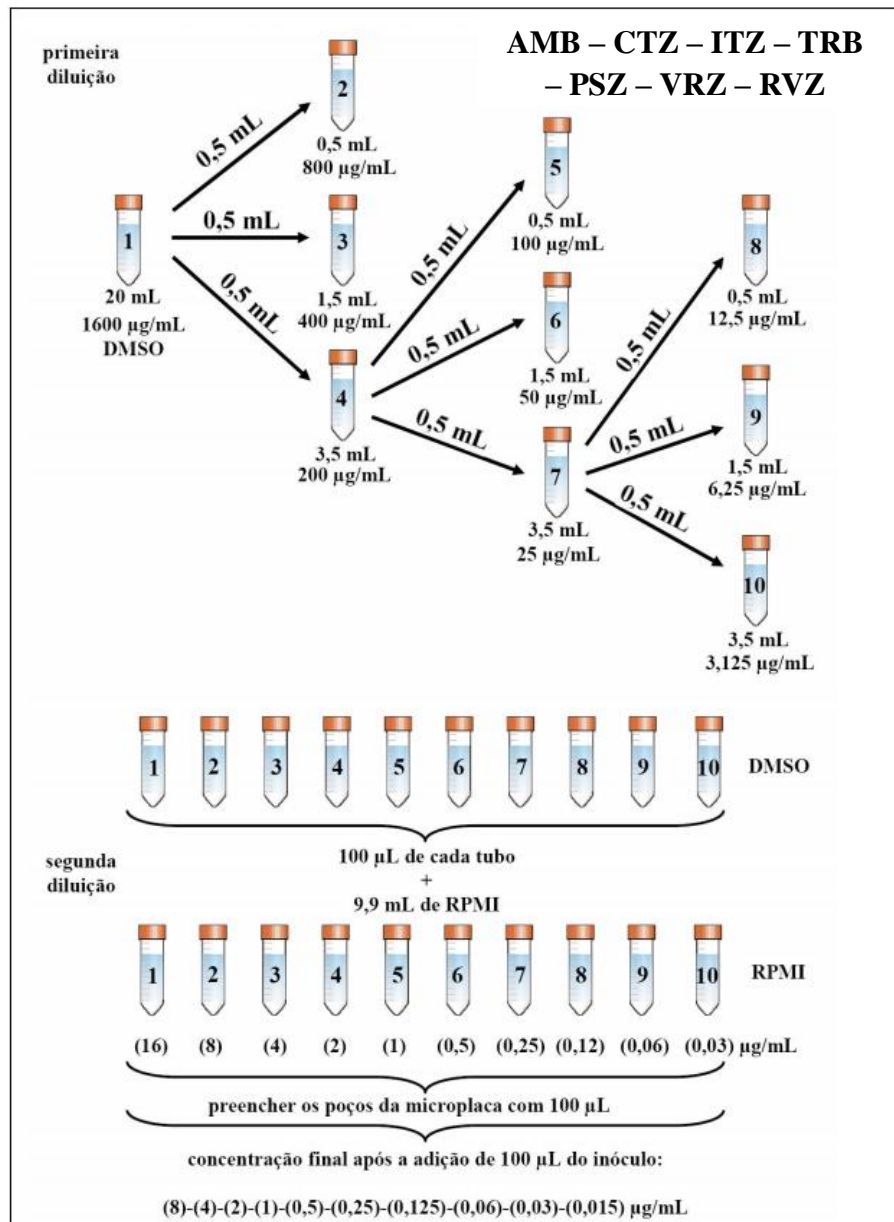


Figura 8: Esquema de diluição de anfotericina B (AMB), cetoconazol (CTZ), itraconazol (ITZ), terbinafina (TRB), posaconazol (PSZ), ravuconazol (RVZ) e voriconazol (VRZ) pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (M38-A2). DMSO = dimetilsulfóxido; RPMI = meio Roswell Park Memorial Institute 1640. OBS: Caspofungina e micafungina foram diluídas da mesma forma, porém utilizando RPMI no lugar do DMSO na primeira diluição.

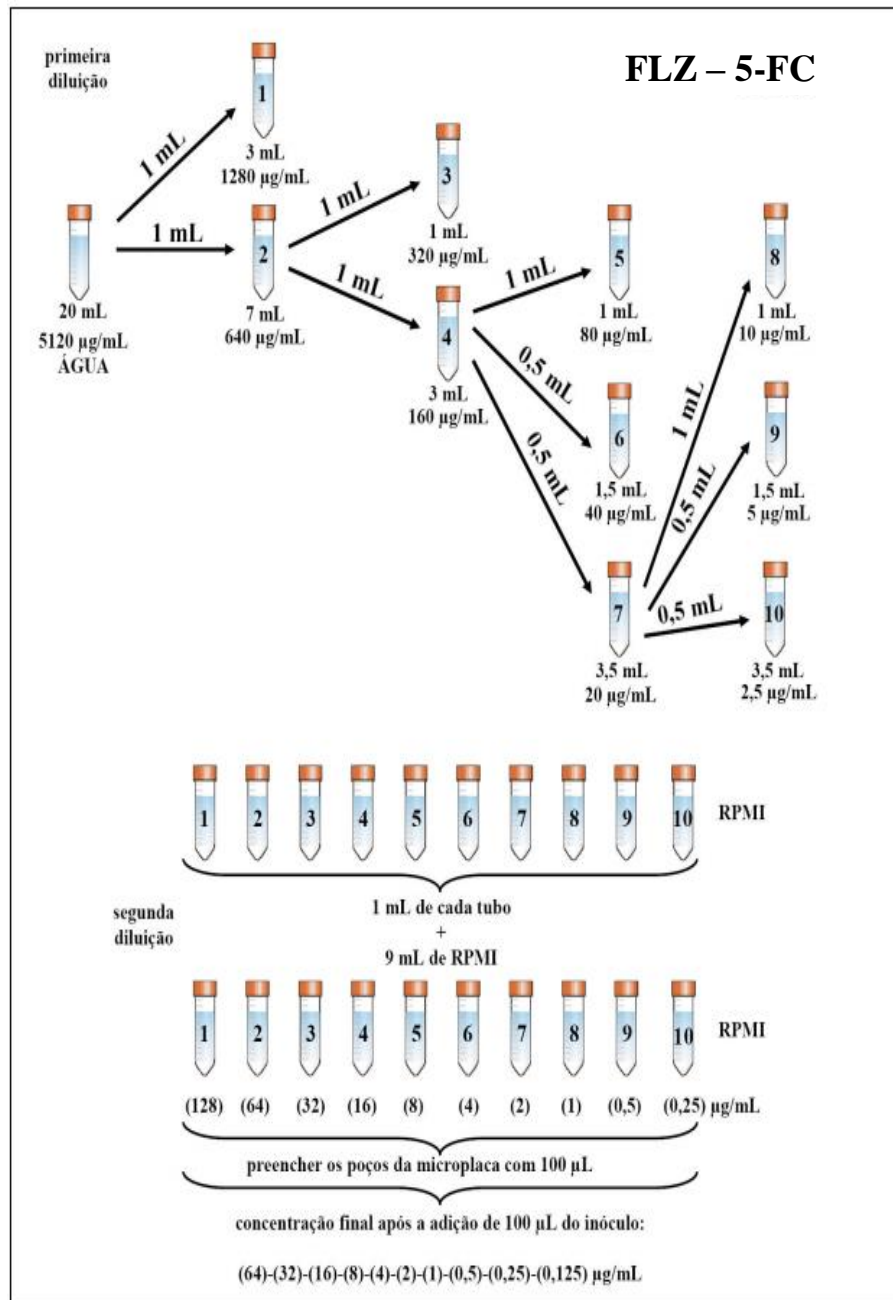


Figura 9: Esquema de diluição do fluconazol (FLZ) e flucitosina (5-FC) pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (M38-A2). RPMI = meio Roswell Park Memorial Institute 1640.

Os poços entre as colunas 02 e 11 das placas de microtitulação de 96 poços (com 8 linhas identificadas de A-H e 12 colunas numeradas de 1 a 12) foram preenchidos com alíquotas de 100 µL das 10 diluições seriadas do antifúngico 2X concentradas. Os poços da coluna 01 foram preenchidos com 200 µL de RPMI-1640 para controle de esterilidade e os poços da coluna 12 foram preenchidos com 100 µL de RPMI-1640 ou 100 µL de RPMI-1640 com DMSO 0,2% para controle de crescimento fúngico. A seguir, as placas contendo os

antifúngicos foram identificadas, fechadas e embaladas com filme PVC, exceto as placas de AMB (fármaco fotossensível), que foram embaladas com papel alumínio. Todas as placas foram mantidas em temperatura de -20°C até o momento do uso, por um período máximo de três meses.

Para obtenção do inóculo dos isolados foi realizado um repique de cada isolado em meio PDA (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Índia) e incubado a 30°C durante sete dias. A seguir, uma suspensão de conídios foi preparada em 3 mL de solução salina estéril e a densidade óptica ajustada com o auxílio de um densitômetro (DensiCHEK plus, Biomérieux) para o padrão n° 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente 10^5 - 10^6 células por mL. Para produzir uma concentração entre $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL), essa suspensão foi diluída a 1:50 em RPMI-1640. Para realização do teste da microdiluição em caldo, as placas de microtitulação foram retiradas da refrigeração e mantidas a temperatura de 35°C por 30 min. Em seguida, alíquotas de 100 μL de cada inóculo foram adicionadas nos poços das placas entre as colunas 02 e 12 reduzindo à metade as diferentes concentrações de antifúngico (Figuras 5 e 6) e também a concentração do inóculo ($0,5$ - $2,5 \times 10^3$ UFC/mL). Em cada placa foram distribuídos seis inóculos dos isolados e duas cepas de referência. As placas foram fechadas e incubadas a 35°C , por 48 horas, para leitura dos controles e, durante cinco dias, para leitura dos isolados. A leitura dos resultados foi realizada num leitor de microplacas (Epoch, Biotek) em comprimento de onda de 530 nm, exceto para os antifúngicos MFG e CAS, que foram lidos visualmente. O controle de esterilidade (sem antifúngico e sem inóculo) preparado em toda a coluna 1 da placa de microtitulação foi utilizado como “branco” no momento da leitura. Os resultados foram analisados e os valores da concentração inibitória mínima (CIM), para AMB, CTZ, ITZ, PSZ, VRZ, RVZ, FLZ, TRB e 5-FC, e da concentração efetiva mínima (CEM), para as equinocandinas (CAS e MFG), foram interpretados de acordo com o protocolo M38-A2 do CLSI.

A CIM é determinada como a menor concentração do antifúngico que inibe substancialmente o crescimento do fungo. Quando testamos antifúngicos da classe das equinocandinas, a avaliação da CEM fornece dados de sensibilidade mais consistentes e reprodutíveis do que a leitura da CIM convencional. A CEM é determinada como a menor concentração do fármaco que leva ao crescimento de formas filamentosas pequenas, arredondadas e compactas em comparação com o crescimento confluyente observado no poço do controle de crescimento (CLSI, 2008).

Para os antifúngicos FLZ, 5-FC e CTZ os valores das CIMs foram definidos como a menor concentração do antifúngico capaz de inibir 50% do crescimento quando comparado ao poço controle - livre do fármaco (coluna 12). Para TRB o valor de CIM foi definido na menor concentração do fármaco capaz de inibir 80% do crescimento fúngico. Para AMB, ITZ, PSZ, RVZ e VRZ o valor de CIM foi definido na menor concentração do fármaco capaz de inibir 100% do crescimento fúngico. Para CAS e MFG (equinocandinas) o valor de CEM foi lido como a menor concentração do fármaco que leva ao crescimento de formas filamentosas pequenas, redondas e compactas comparado ao crescimento do poço controle (Figura 10).



Figura 10: Série de diluição de caspofungina (coluna 12 é o poço controle – livre de fármaco; e colunas de 11 a 1 contém concentrações do fármaco que variam de 0,007 na coluna 11 a 8 µg/mL na coluna 1) vs oito isolados de *Aspergillus* após 24 horas de incubação. CEMs para linhas A e B (*Aspergillus niger*) são os poços da coluna 7 (0,12 µg/mL), e para as linhas C a H (*A. flavus*, *A. terreus* e *A. fumigatus*) são os poços da coluna 6 (0,25 µg/mL). Imagem extraída da página 26 do documento M38-A2 do CLSI.

4.5.2 COMBINAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS: MÉTODO TABULEIRO DE XADREZ

Foram testadas as seguintes combinações de fármacos: itraconazol e terbinafina (ITZ/TRB), anfotericina B e flucitosina (AMB/5-FC) e itraconazol e caspofungina (ITZ/CAS).

Os preparos das soluções estoque dos antifúngicos e das diluições dos fármacos para confecção das placas foram realizados segundo o protocolo M38-A2 do CLSI, conforme o teste de susceptibilidade aos antifúngicos isolados, realizado anteriormente.

O teste foi realizado pelo método tabuleiro de xadrez, no qual dois diferentes fármacos foram aplicados em diferentes concentrações em uma única placa de 96 poços, de forma que em cada um dos poços houvesse concentrações diferentes da combinação entre os antifúngicos.

As preparações de microdiluições seriadas de ITZ/TRB na concentração final de 0,0075 a 4 $\mu\text{g/mL}$ para itraconazol e 0,015 a 1 $\mu\text{g/mL}$ para terbinafina foram realizadas seguindo protocolo, semelhante ao anterior com uma única diferença, neste caso foram distribuídos 50 μL de cada fármaco a combinar, que resultou em um volume final de 100 μL , em cada poço da microplaca, com exceção da primeira coluna reservada para controle do meio (sem o fungo) e o último poço à direita reservado para controle de crescimento do fungo sem antifúngico. A coluna 12 foi reservada para teste de susceptibilidade do fármaco B (TRB). A linha H foi reservada para o fármaco A (ITZ) como demonstrado no esquema a seguir (Figura 8). O mesmo procedimento foi realizado para as outras duas combinações de fármacos na concentração final de 0,0075 a 4 $\mu\text{g/mL}$ para AMB e 0,06 a 4 $\mu\text{g/mL}$ para 5-FC; 0,0075 a 4 $\mu\text{g/mL}$ para CAS e 0,06 a 4 $\mu\text{g/mL}$ para ITZ (Figura 11).

A

Itraconazol (ITZ) + Terbinafina (TRB) (µg/mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CE	ITZ 4,0 TRB 1,0	ITZ 2,0 TRB 1,0	ITZ 1,0 TRB 1,0	ITZ 1,0 TRB 1,0	ITZ 0,25 TRB 1,0	ITZ 0,12 TRB 1,0	ITZ 0,06 TRB 1,0	ITZ 0,03 TRB 1,0	ITZ 0,015 TRB 1,0	ITZ 0,0075 TRB 1,0	TRB 1,0
B	CE	ITZ 4,0 TRB 0,5	ITZ 2,0 TRB 0,5	ITZ 1,0 TRB 0,5	ITZ 0,5 TRB 0,5	ITZ 0,25 TRB 0,5	ITZ 0,12 TRB 0,5	ITZ 0,06 TRB 0,5	ITZ 0,03 TRB 0,5	ITZ 0,015 TRB 0,5	ITZ 0,0075 TRB 0,5	TRB 0,5
C	CE	ITZ 4,0 TRB 0,25	ITZ 2,0 TRB 0,25	ITZ 1,0 TRB 0,25	ITZ 0,5 TRB 0,25	ITZ 0,25 TRB 0,25	ITZ 0,12 TRB 0,25	ITZ 0,06 TRB 0,25	ITZ 0,03 TRB 0,25	ITZ 0,015 TRB 0,25	ITZ 0,0075 TRB 0,25	TRB 0,25
D	CE	ITZ 4,0 TRB 0,12	ITZ 2,0 TRB 0,12	ITZ 1,0 TRB 0,12	ITZ 0,5 TRB 0,12	ITZ 0,25 TRB 0,12	ITZ 0,12 TRB 0,12	ITZ 0,06 TRB 0,12	ITZ 0,03 TRB 0,12	ITZ 0,015 TRB 0,12	ITZ 0,0075 TRB 0,12	TRB 0,12
E	CE	ITZ 4,0 TRB 0,06	ITZ 2,0 TRB 0,06	ITZ 1,0 TRB 0,06	ITZ 0,5 TRB 0,06	ITZ 0,25 TRB 0,06	ITZ 0,12 TRB 0,06	ITZ 0,06 TRB 0,06	ITZ 0,03 TRB 0,06	ITZ 0,015 TRB 0,06	ITZ 0,0075 TRB 0,06	TRB 0,06
F	CE	ITZ 4,0 TRB 0,03	ITZ 2,0 TRB 0,03	ITZ 1,0 TRB 0,03	ITZ 0,5 TRB 0,03	ITZ 0,25 TRB 0,03	ITZ 0,12 TRB 0,03	ITZ 0,06 TRB 0,03	ITZ 0,03 TRB 0,03	ITZ 0,015 TRB 0,03	ITZ 0,0075 TRB 0,03	TRB 0,03
G	CE	ITZ 4,0 TRB 0,015	ITZ 2,0 TRB 0,015	ITZ 1,0 TRB 0,015	ITZ 0,5 TRB 0,015	ITZ 0,25 TRB 0,015	ITZ 0,12 TRB 0,015	ITZ 0,06 TRB 0,015	ITZ 0,03 TRB 0,015	ITZ 0,015 TRB 0,015	ITZ 0,0075 TRB 0,015	TRB 0,015
H	CE	ITZ 4,0	ITZ 2,0	ITZ 1,0	ITZ 0,5	ITZ 0,25	ITZ 0,12	ITZ 0,06	ITZ 0,03	ITZ 0,015	ITZ 0,0075	CC

B

Anfotericina (AMB) + flucitosina (5-FC) (µg/mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	CE	AMB 4,0 5-FC 4,0	AMB 2,0 5-FC 4,0	AMB 1,0 5-FC 4,0	AMB 1,0 5-FC 4,0	AMB 0,5 5-FC 4,0	AMB 0,25 5-FC 4,0	AMB 0,12 5-FC 4,0	AMB 0,06 5-FC 4,0	AMB 0,03 5-FC 4,0	AMB 0,015 5-FC 4,0	AMB 0,0075 5-FC 4,0	5-FC 4,0
B	CE	AMB 4,0 5-FC 2,0	AMB 2,0 5-FC 2,0	AMB 1,0 5-FC 2,0	AMB 0,5 5-FC 2,0	AMB 0,25 5-FC 2,0	AMB 0,12 5-FC 2,0	AMB 0,06 5-FC 2,0	AMB 0,03 5-FC 2,0	AMB 0,015 5-FC 2,0	AMB 0,0075 5-FC 2,0	5-FC 2,0	
C	CE	AMB 4,0 5-FC 1,0	AMB 2,0 5-FC 1,0	AMB 1,0 5-FC 1,0	AMB 0,5 5-FC 1,0	AMB 0,25 5-FC 1,0	AMB 0,12 5-FC 1,0	AMB 0,06 5-FC 1,0	AMB 0,03 5-FC 1,0	AMB 0,015 5-FC 1,0	AMB 0,0075 5-FC 1,0	5-FC 1,0	
D	CE	AMB 4,0 5-FC 0,5	AMB 2,0 5-FC 0,5	AMB 1,0 5-FC 0,5	AMB 0,5 5-FC 0,5	AMB 0,25 5-FC 0,5	AMB 0,12 5-FC 0,5	AMB 0,06 5-FC 0,5	AMB 0,03 5-FC 0,5	AMB 0,015 5-FC 0,5	AMB 0,0075 5-FC 0,5	5-FC 0,5	
E	CE	AMB 4,0 5-FC 0,25	AMB 2,0 5-FC 0,25	AMB 1,0 5-FC 0,25	AMB 0,5 5-FC 0,25	AMB 0,25 5-FC 0,25	AMB 0,12 5-FC 0,25	AMB 0,06 5-FC 0,25	AMB 0,03 5-FC 0,25	AMB 0,015 5-FC 0,25	AMB 0,0075 5-FC 0,25	5-FC 0,25	
F	CE	AMB 4,0 5-FC 0,12	AMB 2,0 5-FC 0,12	AMB 1,0 5-FC 0,12	AMB 0,5 5-FC 0,12	AMB 0,25 5-FC 0,12	AMB 0,12 5-FC 0,12	AMB 0,06 5-FC 0,12	AMB 0,03 5-FC 0,12	AMB 0,015 5-FC 0,12	AMB 0,0075 5-FC 0,12	5-FC 0,12	
G	CE	AMB 4,0 5-FC 0,06	AMB 2,0 5-FC 0,06	AMB 1,0 5-FC 0,06	AMB 0,5 5-FC 0,06	AMB 0,25 5-FC 0,06	AMB 0,12 5-FC 0,06	AMB 0,06 5-FC 0,06	AMB 0,03 5-FC 0,06	AMB 0,015 5-FC 0,06	AMB 0,0075 5-FC 0,06	5-FC 0,06	
H	CE	AMB 4,00	AMB 2,00	AMB 1,00	AMB 0,5	AMB 0,25	AMB 0,12	AMB 0,06	AMB 0,03	AMB 0,015	AMB 0,0075	CC	

C

Caspofungina (CAS) + Itraconazol (ITZ) (µg/mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CE	CAS 4,0 ITZ 4,0	CAS 2,0 ITZ 4,0	CAS 1,0 ITZ 4,0	CAS 0,5 ITZ 4,0	CAS 0,25 ITZ 4,0	CAS 0,12 ITZ 4,0	CAS 0,06 ITZ 4,0	CAS 0,03 ITZ 4,0	CAS 0,015 ITZ 4,0	CAS 0,0075 ITZ 4,0	ITZ 4,0
B	CE	CAS 4,0 ITZ 2,0	CAS 2,0 ITZ 2,0	CAS 1,0 ITZ 2,0	CAS 0,5 ITZ 2,0	CAS 0,25 ITZ 2,0	CAS 0,12 ITZ 2,0	CAS 0,06 ITZ 2,0	CAS 0,03 ITZ 2,0	CAS 0,015 ITZ 2,0	CAS 0,0075 ITZ 2,0	ITZ 2,0
C	CE	CAS 4,0 ITZ 1,0	CAS 2,0 ITZ 1,0	CAS 1,0 ITZ 1,0	CAS 0,5 ITZ 1,0	CAS 0,25 ITZ 1,0	CAS 0,12 ITZ 1,0	CAS 0,06 ITZ 1,0	CAS 0,03 ITZ 1,0	CAS 0,015 ITZ 1,0	CAS 0,0075 ITZ 1,0	ITZ 1,0
D	CE	CAS 4,0 ITZ 0,5	CAS 2,0 ITZ 0,5	CAS 1,0 ITZ 0,5	CAS 0,5 ITZ 0,5	CAS 0,25 ITZ 0,5	CAS 0,12 ITZ 0,5	CAS 0,06 ITZ 0,5	CAS 0,03 ITZ 0,5	CAS 0,015 ITZ 0,5	CAS 0,0075 ITZ 0,5	ITZ 0,5
E	CE	CAS 4,0 ITZ 0,25	CAS 2,0 ITZ 0,25	CAS 1,0 ITZ 0,25	CAS 0,5 ITZ 0,25	CAS 0,25 ITZ 0,25	CAS 0,12 ITZ 0,25	CAS 0,06 ITZ 0,25	CAS 0,03 ITZ 0,25	CAS 0,015 ITZ 0,25	CAS 0,0075 ITZ 0,25	ITZ 0,25
F	CE	CAS 4,0 ITZ 0,12	CAS 2,0 ITZ 0,12	CAS 1,0 ITZ 0,12	CAS 0,5 ITZ 0,12	CAS 0,25 ITZ 0,12	CAS 0,12 ITZ 0,12	CAS 0,06 ITZ 0,12	CAS 0,03 ITZ 0,12	CAS 0,015 ITZ 0,12	CAS 0,0075 ITZ 0,12	ITZ 0,12
G	CE	CAS 4,0 ITZ 0,06	CAS 2,0 ITZ 0,06	CAS 1,0 ITZ 0,06	CAS 0,5 ITZ 0,06	CAS 0,25 ITZ 0,06	CAS 0,12 ITZ 0,06	CAS 0,06 ITZ 0,06	CAS 0,03 ITZ 0,06	CAS 0,015 ITZ 0,06	CAS 0,0075 ITZ 0,06	ITZ 0,06
H	CE	CAS 4,0	CAS 2,0	CAS 1,0	CAS 0,5	CAS 0,25	CAS 0,12	CAS 0,06	CAS 0,03	CAS 0,015	CAS 0,0075	CC

Figura 11: Esquema das concentrações (µg/mL) dos fármacos em combinação: **A-** itraconazol e terbinafina; **B-** anfotericina B e flucitosina; **C-** itraconazol e caspofungina na placa de 96 poços. CE: controle do meio de cultivo; CC: controle de crescimento do fungo sem os fármacos.

Foi determinado o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) que define o tipo de interação entre os antifúngicos em combinação da seguinte forma: sinergismo se $ICIF \leq 0,5$; indiferença se $0,5 < ICIF \leq 4$ e antagonismo se $ICIF > 4$ (DANNAOUI et al., 2002).

O ICIF foi obtido pelo somatório das concentrações inibitórias fracionais (CIF) ou pela fórmula: $(A/CIM(a) = CIFA) + (B/CIM(b) = CIFB) = ICIF$, onde: A= CIM do fármaco (a) em combinação; CIM (a) = CIM do fármaco (a) sozinho; B = CIM do fármaco (b) em combinação; CIM (b) = CIM do fármaco (b) sozinho (BARCHIESI; DI FRANCESCO; SCALISE, 1997; GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2003).

4.6 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DA MELANINA

Após crescimento em meio PDA (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Índia) durante sete dias a 30°C, quatro isolados do estudo foram selecionados aleatoriamente e cultivados em meio PDA adicionado de solução de triciclazol (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA) nas concentrações 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L e 16 mg/L para determinar a concentração mínima de triciclazol com capacidade de inibir a produção de melanina nos quatro isolados. O triciclazol foi previamente dissolvido em etanol e adicionado ao meio de cultura, garantindo que a concentração de solvente não ultrapassasse 0,6%, de modo que não houvesse efeito citotóxico sobre os fungos (CUNHA et al., 2005). Como controle, o fungo foi cultivado na ausência do triciclazol. Foi realizada a leitura após 7 dias de incubação a 30°C e 35°C.

Após esse teste inicial com quatro isolados, todos os isolados foram cultivados na presença de triciclazol na menor concentração capaz de inibir a síntese de melanina nos isolados selecionados com um inóculo, de aproximadamente 1mm², no centro da placa, e incubados a 30°C e 35°C, durante 7 dias.

4.7 EFEITOS DA MELANINA NA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Sete isolados de *Fonsecaea* spp. foram aleatoriamente selecionados para avaliação do impacto da melanização na resistência deste gênero aos fármacos antifúngicos. Estes isolados foram testados frente aos fármacos que apresentaram menor efetividade *in vitro* nos

experimentos de determinação da CIM, sendo selecionados pelo menos um representante de cada classe de antifúngicos (poliênicos, azólicos, equinocandinas e análogo de pirimidina).

O teste foi realizado segundo a metodologia descrita por Almeida-Paes e colaboradores (2016) com pequenas modificações (ALMEIDA-PAES et al., 2016a). Os isolados foram cultivados em meio PDA com triciclazol, na menor concentração capaz de inibir a melanina, e incubados a 30°C durante sete dias. Como controle, os mesmos isolados foram cultivados em meio PDA sem a presença do inibidor de melanina. O inóculo foi preparado em salina usando a escala 0,5 McFarland, com o auxílio de densitômetro (DensiCHEK plus, Biomérieux), e incubado com os fármacos antifúngicos descritos acima em uma concentração equivalente à metade da CIM encontrada para esses isolados na técnica da microdiluição em caldo. Após 2 e 24 horas de incubação, foram realizadas diluições seriadas e semeaduras em placas contendo ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 35°C por sete dias para contagem de colônias. A porcentagem de células viáveis frente aos diferentes fármacos foi comparada entre células melanizadas e com a melanização inibida, nos dois tempos de incubação testados. Como controle, no tempo zero, foi realizada a diluição seriada e semeadura sem a adição do fármaco tanto do fungo melanizado quanto não melanizado.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas análises estatísticas descritivas de frequência acumulada no software Statistical Package for the Social Science (SPSS) versão 17.0 para determinar: (1) o intervalo de CIM representando o limite superior e inferior das CIMs de cada antifúngico frente as diferentes espécies de *Fonsecaea*; (2) a CIM₅₀ que equivale a concentração inibitória mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados testados; (3) a CIM₉₀ definida como a concentração inibitória mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados testados e (4) a média geométrica das CIMs.

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as CIMs entre as três espécies. Quando houve diferença, o teste das múltiplas comparações de Dunn foi empregado para analisar os pares específicos que apresentam diferença significativa. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 REISOLAMENTO

Todos os isolados em estudo foram reisolados e as características macro e micromorfológicas das colônias foram observadas. Macroscopicamente, as colônias apresentaram aspecto aveludado, anverso com coloração verde oliva a negro (Figura 12A) e reverso negro (Figura 12B). Já microscopicamente, pela técnica de microcultivo, foram observadas hifas septadas, ramificadas, de coloração marrom com o predomínio de conidiação do tipo *Cladosporium* de cadeia curta (Figura 12C).

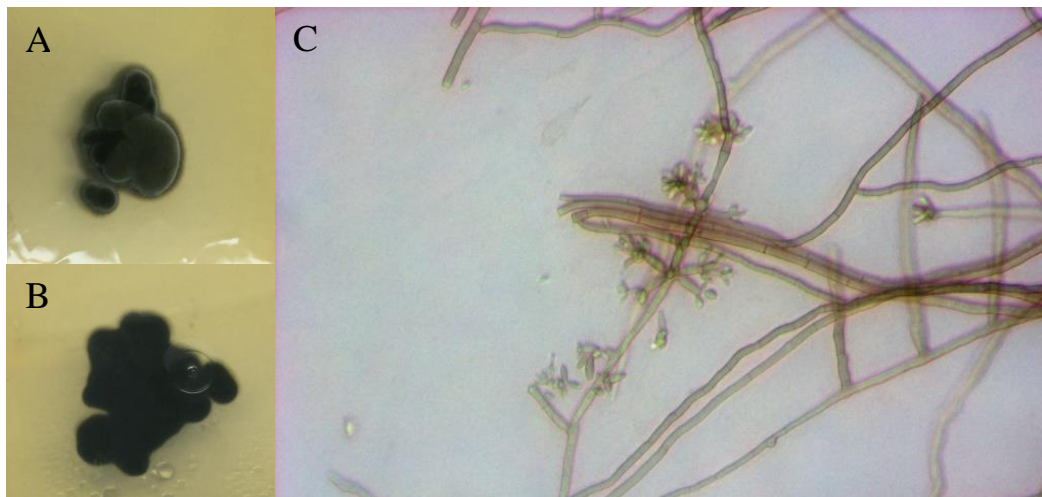


Figura 12: A e B: Aspecto macromorfológico de *Fonsecaea* spp. em meio ágar batata dextrose. C: Aspecto micromorfológico pela técnica de microcultivo em lâmina de *Fonsecaea* spp. Fonte: Rowena A. Coelho / Leonardo S. Barbedo (INI/Fiocruz, 2016).

5.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A identificação molecular foi realizada pela amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rADN. Todos os isolados clínicos deste estudo foram caracterizados molecularmente, sendo cinco isolados identificados como *Fonsecaea nubica*, cinco isolados identificados como *Fonsecaea pedrosoi* e dez isolados identificados como *Fonsecaea monophora*.

Todos os isolados apresentaram 99-100% de similaridade quando comparados com sequências disponíveis nos bancos de dados do NCBI/*GenBank* e do ISHAM-ITS (Figura 13).

Todas as sequencias obtidas para a região ITS1-5.8S-ITS2 do rADN foram depositadas no *GenBank* sob os números de acesso MF616485 - MF616504.

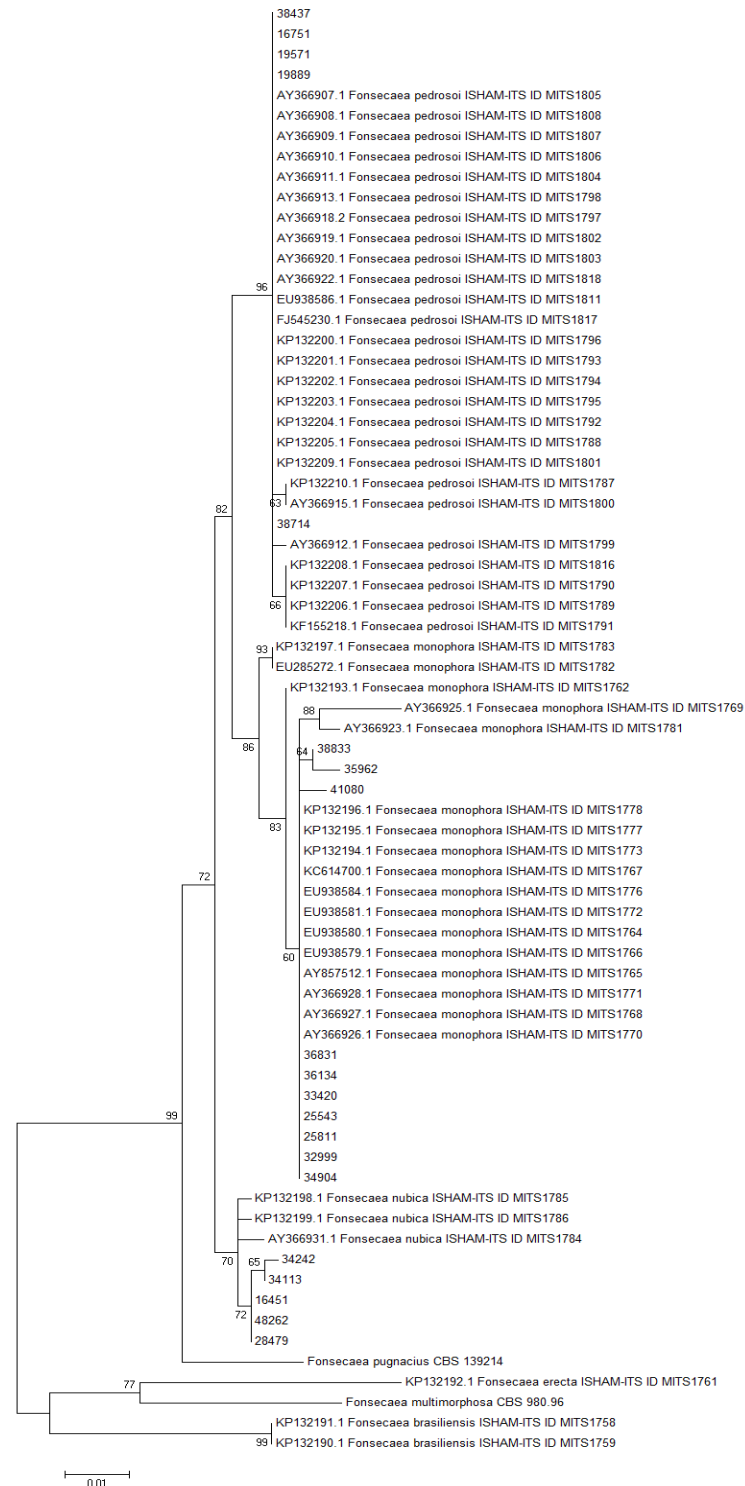


Figura 13: Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança.

A história evolutiva foi inferida usando o método de Máxima Verossimilhança com base no modelo Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993). A porcentagem de árvores nas quais os taxons associados se agrupam são mostradas ao lado dos ramos. As árvores iniciais para a pesquisa heurística foram obtidas automaticamente, aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias por pares estimada usando a abordagem *Maximum Composite Likelihood* (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com um valor superior de probabilidade de log. A análise envolveu 72 sequências de nucleotídeos. Todas as posições que continham lacunas e dados em falta foram eliminadas. Havia um total de 481 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas utilizando o programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

5.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Os 20 isolados clínicos de *Fonsecaea* spp. deste estudo foram testados frente a 11 antifúngicos. Os valores de CIM obtidos pelo CLSI (M38-A2) para os isolados de *Fonsecaea* spp. estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de CIM/CEM de 11 fármacos antifúngicos para isolados clínicos de *Fonsecaea* spp.

Espécies (nº de isolados) e fármacos testados	CIM/CEM ($\mu\text{g/mL}$)			Média geométrica
	Variação	50%	90%	
<i>Fonsecaea</i> spp. (n = 20)				
Anfotericina B	4- \geq 16	8	8	5,77
Cetoconazol	0,06-0,50	0,25	0,50	0,19
Fluconazol	8-32	16	16	12,55
Itraconazol	0,25-1	0,50	1	0,57
Posaconazol	0,06-0,50	0,12	0,50	0,16
Ravuconazol	0,25-1	0,50	1	0,64
Voriconazol	0,12-0,25	0,12	0,25	0,14
Flucitosina	2-32	8	16	6,28
Terbinafina	0,015-0,25	0,12	0,25	0,09
Caspofungina	1->8	2	4	1,73
Micafungina	1-8	8	8	5,66
<i>Fonsecaea monophora</i> (n = 10)				
Anfotericina B	4- \geq 16	8	8	7,46
Cetoconazol	0,12-0,25	0,25	0,25	0,17
Fluconazol	8-16	16	16	11,31
Itraconazol	0,25-1	0,50	1	0,57
Posaconazol	0,06-0,25	0,12	0,25	0,13
Ravuconazol	0,25-1	0,50	1	0,62
Voriconazol	0,12-0,25	0,12	0,25	0,13
Flucitosina	2-16	8	16	6,50
Terbinafina	0,06-0,25	0,12	0,25	0,09
Caspofungina	1-4	2	4	1,74
Micafungina	8-8	8	8	8,00
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> (n = 5)				
Anfotericina B	4-8	4	4	4,59
Cetoconazol	0,06-0,50	0,25	0,25	0,19
Fluconazol	8-16	16	16	12,13
Itraconazol	0,25-1	0,50	0,50	0,44
Posaconazol	0,06-0,50	0,25	0,25	0,19
Ravuconazol	0,25-1	0,50	0,50	0,50
Voriconazol	0,12-0,25	0,12	0,12	0,14
Flucitosina	4-32	16	16	10,56
Terbinafina	0,06-0,12	0,12	0,12	0,10
Caspofungina	2-2	2	2	2,00
Micafungina	1-8	1	1	2,00
<i>Fonsecaea nubica</i> (n = 5)				
Anfotericina B	4- \geq 16	4	4	5,28
Cetoconazol	0,12-0,50	0,25	0,25	0,25
Fluconazol	8-32	16	16	16,00

Itraconazol	0,25-1	0,25	0,25	0,76
Posaconazol	0,12-0,50	0,25	0,25	0,21
Ravuconazol	0,50-1	1	1	0,87
Voriconazol	0,12-0,25	0,25	0,25	0,19
Flucitosina	2-4	4	4	3,48
Terbinafina	0,015-0,25	0,12	0,12	0,08
Caspofungina	1- \geq 16	2	2	2,00
Micafungina	8-8	8	8	8,00

CIM: Concentração inibitória mínima, CEM: Concentração efetiva mínima.

TRB e VRZ foram os fármacos que apresentaram melhor atividade *in vitro* no presente estudo contra todas as espécies de *Fonsecaea* testadas, ambos com CIM₉₀ de 0,25 µg/mL. Os fármacos FLZ, 5-FC, AMB e MFG apresentaram CIMs mais elevadas frente às três espécies, correspondendo a CIM de 16, 16, 8 e 8 µg/mL, respectivamente.

Avaliando o perfil de susceptibilidade aos fármacos antifúngicos entre as espécies, tendo como base variações em mais de duas diluições entre as CIMs/CEMs, *F. pedrosoi* apresentou CEM₉₀ de 1 µg/mL para a MFG, enquanto *F. monophora* e *F. nubica* apresentaram, ambas, CEM₉₀ de 8 µg/mL. Com relação ao fármaco 5-FC, *F. nubica* apresentou CIM₉₀ de 4 µg/mL, enquanto as outras espécies, CIM₉₀ de 16 µg/mL.

Entre os isolados de *Fonsecaea* spp., apenas um isolado de *Fonsecaea nubica* apresentou CEM \geq 8 µg/mL para CAS enquanto os outros apresentaram CEMs entre 1 e 4 µg/mL.

Após análise estatística verificamos que houve diferença entre as espécies *F. monophora* e *F. pedrosoi* (p=0,0447), em que a primeira apresentou valores de CIM mais elevados para AMB. Observamos também que as espécies *F. monophora* e *F. nubica* apresentaram valores de CEM mais elevados para o fármaco MFG quando comparados à espécie *F. pedrosoi* (p=0,0009). Para os outros fármacos, não houve diferença significativa entre as espécies (Figura 14).

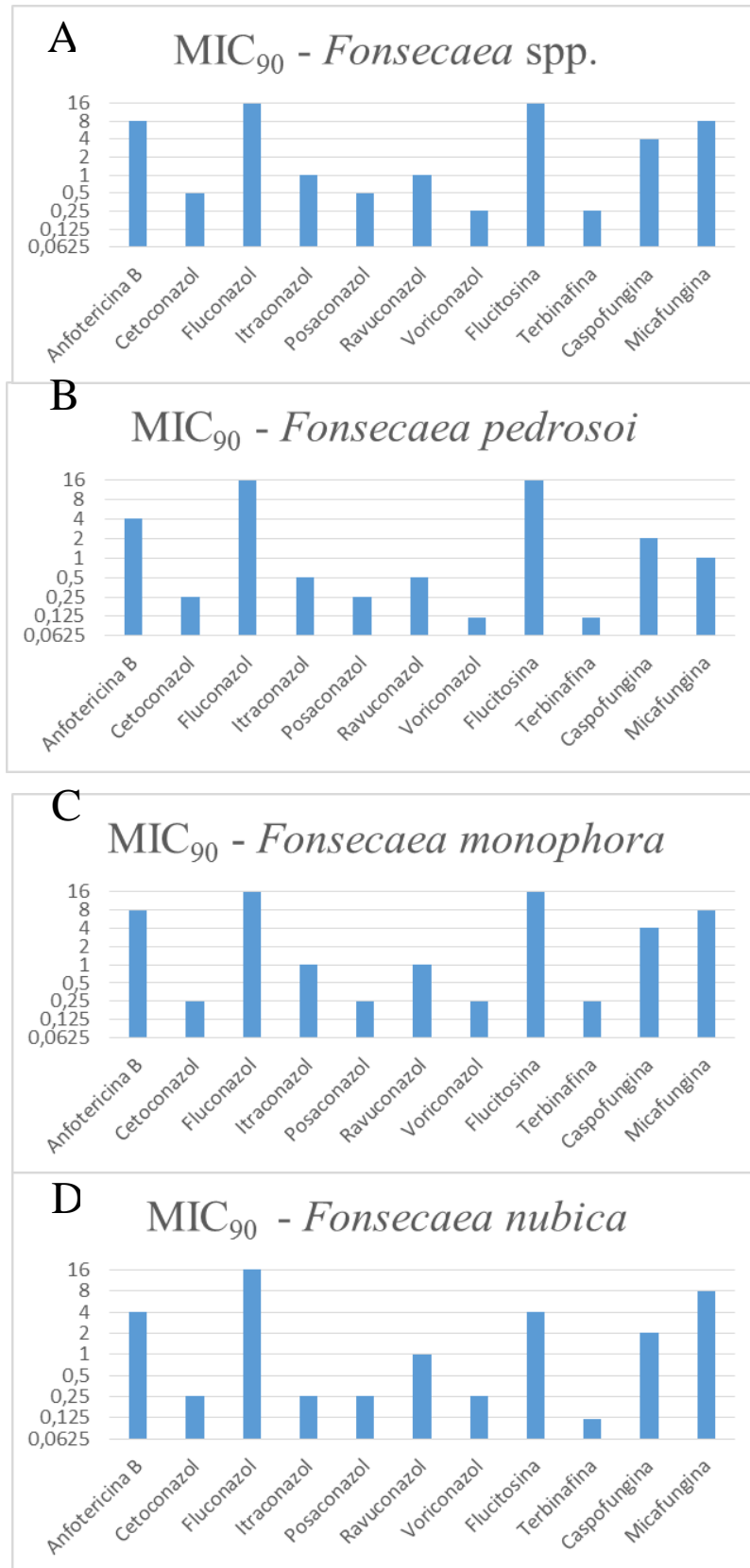


Figura 14: Gráficos do perfil de susceptibilidade *in vitro* aos fármacos antifúngicos. A: Todos os isolados de *Fonsecaea* spp., B: Isolados de *F. pedrosoi*. C: Isolados de *F. monophora*. D: Isolados de *F. nubica*.

5.4 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA (ICIF)

No presente estudo, os 20 isolados clínicos de *Fonsecaea* spp. foram testados frente a três combinações de antifúngicos. Os resultados foram expressos na Tabela 3.

De acordo com o ICIF, quando os fármacos 5-FC e AMB foram testados em combinação, foi observada interação sinérgica ($ICIF < 0,5$) em três isolados de *Fonsecaea monophora*.

Já para as combinações dos antifúngicos ITZ e TRB, e ITZ e CAS, foi observada interação indiferente ($0,5 > ICIF \leq 4,0$) para todos os isolados testados.

Tabela 3: Valores de ICIF de três combinações de antifúngicos frente a 20 isolados clínicos de *Fonsecaea* spp.

Isolados	Espécies	CIM (µg/mL) dos seguintes fármacos			ICIF para TRB/ITZ	CIM (µg/mL) dos seguintes fármacos			ICIF para 5FC/AMB	CIM (µg/mL) dos seguintes fármacos			ICIF para ITZ/CAS
		TRB	ITZ	TRB/ITZ		5FC	AMB	5FC/AMB		ITZ	CAS	ITZ/CAS	
16751-1	<i>F. pedrosoi</i>	0,03	0,25	0,015/0,5	2,50	4	4	4/2	1,50	0,25	2	0,25/2	2
16451	<i>F. nubica</i>	0,12	1	0,12/1	2	4	4	4/2	1,50	1	≥16	0,5/1	0,5625
19571	<i>F. pedrosoi</i>	0,12	0,5	0,03/0,5	1,25	16	4	4/2	0,75	0,5	2	0,25/2	1,50
19889	<i>F. pedrosoi</i>	0,12	1	0,06/0,5	1	16	4	1/4	1,0625	1	4	0,25/2	0,75
25543	<i>F. monophora</i>	0,12	0,5	0,06/0,12	0,75	2	4	1/2	1	0,5	2	0,25/2	1,50
25811	<i>F. monophora</i>	0,12	0,25	0,06/0,25	1,50	2	8	4/2	2,25	0,25	4	0,25/2	1,50
28479	<i>F. nubica</i>	0,12	0,25	0,06/0,25	1,50	4	≥16	2/4	0,75	0,25	2	0,25/2	2
32999	<i>F. monophora</i>	0,12	0,25	0,06/0,25	1,50	8	8	0,25/4	0,53125	0,25	2	0,25/2	2
33420	<i>F. monophora</i>	0,12	1	0,06/0,5	1	8	8	0,06/4	0,5078125	1	2	0,25/2	1,25
34113	<i>F. nubica</i>	0,12	1	0,06/0,5	1	4	4	2/2	1	1	2	0,5/0,5	0,75
34242	<i>F. nubica</i>	0,12	1	0,12/0,5	1,50	4	8	4/2	1,25	1	4	0,5/2	1
34904	<i>F. monophora</i>	0,12	1	0,12/0,25	1,25	8	≥16	1/4	0,375	1	4	0,5/1	0,75
35962	<i>F. monophora</i>	0,12	0,5	0,03/0,5	1,25	16	8	1/4	0,5625	0,5	4	0,25/2	1
36134	<i>F. monophora</i>	0,12	1	0,03/0,5	0,75	8	≥16	1/4	0,375	1	4	0,25/2	0,75
36831	<i>F. monophora</i>	0,12	0,5	0,06/0,25	1	16	8	2/2	0,375	0,5	4	0,25/2	1
38437	<i>F. pedrosoi</i>	0,12	0,25	0,06/0,25	1,50	≥16	8	4/4	0,75	0,25	2	0,25/2	2
38714	<i>F. pedrosoi</i>	0,12	0,5	0,06/0,5	1,50	4	4	2/2	1	0,5	2	0,25/2	1,50
38833	<i>F. monophora</i>	0,12	1	0,06/0,12	0,625	8	8	4/4	1	1	2	0,25/1	0,75
41080	<i>F. monophora</i>	0,12	0,5	0,06/0,12	0,75	4	8	4/2	1,25	0,5	2	0,25/2	1,50
48262	<i>F. nubica</i>	0,03	1	0,015/0,5	1	2	4	0,06/4	1,03125	1	2	0,25/2	1,25

TRB: terbinafina; ITZ: itraconazol; TRB/ITZ: terbinafina em combinação com itraconazol; 5FC: flucitosina; AMB: anfotericina B; 5FC/AMB: flucitosina em combinação com anfotericina B; CAS: caspofungina; ITZ/CAS: itraconazol em combinação com caspofungina. *Considerou-se no cálculo do ICIF CIM 16 µg/mL para aqueles ≥16 µg/mL

5.5 CORRELAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL

Com relação às variáveis clínico-epidemiológicas dos pacientes dos quais os isolados incluídos no estudo foram obtidos, 14 eram homens e três mulheres. Desses 17 pacientes, foi possível obter dados de 12 que foram acompanhados no INI. Os cinco pacientes restantes eram do sexo masculino, mas não foi possível obter as variáveis demográficas, epidemiológicas e clínicas pois foram tratados em outras instituições. Os detalhes dos 12 casos estão expressos na tabela 4. Os 12 pacientes apresentaram uma média de 55,3 anos de idade. Nove pacientes tinham ocupações, incluindo contato com solo (pedreiros, jardineiros, pintor de casas, agricultores). Seis pacientes nasceram no sudeste do Brasil (três no estado do Rio de Janeiro), cinco pacientes nasceram na região nordeste do país e um paciente nasceu em Portugal. Oito pacientes residiam na cidade do Rio de Janeiro no momento do diagnóstico e os outros quatro também moravam no estado do Rio de Janeiro. A fonte de transmissão não foi documentada, e apenas em dois casos foi encontrada essa associação (mordida de cachorro em um homem do estado da Paraíba, no Nordeste e arranhão com uma planta em um homem de Minas Gerais, no Sudeste). O tempo de evolução da doença até o diagnóstico no Instituto foi obtida para 11 pacientes e variou de 2 meses a 32 anos (mediana=2 anos). Onze pacientes apresentaram lesões localizadas, com alta predominância das lesões verrucosas (n=6) (Figura 15), enquanto que apenas um paciente apresentava lesões verrucosas disseminadas. Oito casos foram considerados moderados e quatro, graves.

Tabela 4: Dados dos 17 pacientes com CBM incluídos nesse estudo.

N	Número do isolado	Sexo	Espécies	Idade	Ocupação	Naturalidade ^b	Local de residência	Tempo de evolução	Forma Clínica	Gravidade	Desfecho
1	16751-1	M	<i>F. pedrosoi</i>					ND			
2	16451	M	<i>F. nubica</i>					ND			
3 ^a	19571/19889	F	<i>F. pedrosoi</i>	42	Empregada doméstica	PB	Teresópolis	20 anos	Verrucosa localizada (MI)	Moderada	Abandono
4 ^a	25543	M	<i>F. monophora</i>	72	Jardineiro	Portugal	Rio de Janeiro	32 anos	Verrucosa localizada (face - extensa)	Grave	Cura
5 ^a	25811	M	<i>F. monophora</i>	65	Agricultor	RJ	Bom Jardim	2 anos	Tumoral localizada (MI)	Grave	NI
6 ^a	28479	F	<i>F. nubica</i>	50	Do lar	ES	São João de Meriti	8 meses	Verrucosa localizada (MI)	Moderada	Cura
7 ^a	32999	F	<i>F. monophora</i>	36	Do lar	RJ	Rio de Janeiro	4 meses	Verrucosa localizada (MI)	Moderada	Cura
8 ^a	33420	M	<i>F. monophora</i>	45	Pedreiro	PB	Rio de Janeiro	9 meses	Verrucosa localizada (MS)	Moderada	Cura
9 ^a	34113/34242	M	<i>F. nubica</i>	83	Jardineiro	MG	Itatiaia	10 anos	Verrucosa localizada (MS)	Moderada	Abandono
10	34904	M	<i>F. monophora</i>					ND			
11	35962/36831	M	<i>F. monophora</i>	53	Pintor	PB	Rio de Janeiro	3 anos	Verrucosa disseminada (MI/MS)	Grave	Cura
12	36134	M	<i>F. monophora</i>	35	Agricultor	MG	Rio de Janeiro	ND	Verrucosa localizada (MS)	Moderada	Cura
13	38437	M	<i>F. pedrosoi</i>					ND			
14	38714	M	<i>F. pedrosoi</i>					ND			
15	38833	M	<i>F. monophora</i>	60	Pedreiro	RJ	Rio de Janeiro	8 meses	Verrucosa localizada (MI)	Moderada	Cura
16	41080	M	<i>F. monophora</i>	58	Pedreiro	PB	Rio de Janeiro	2 meses	Verrucosa localizada (MS)	Moderada	Cura
17	48262	M	<i>F. nubica</i>	65	Pedreiro	CE	Rio de Janeiro	10 anos	Verrucosa localizada (MI - extensiva)	Grave	Cura

^a Casos 3-9 foram clinicamente avaliados previamente por (MOUCHALOUAT et al., 2011) / M: Masculino, F: Feminino. ND: Dados não disponíveis / NI: Não informado, paciente transferido para outra unidade; MI: Membro inferior; MS: Membro superior. ^b Estado do Brasil onde o paciente nasceu, exceto paciente 4, que nasceu em Portugal. CE: Ceará, ES: Espírito Santo, MG: Minas Gerais, PB: Paraíba, RJ: Rio de Janeiro.



Figura 15: Paciente 15 (vide tabela 4) apresentando placa predominantemente verrucosa sobre o joelho direito – CBM moderada. Fonte: Foto cedida pelo Dr. Antonio Carlos F. do Valle.

Sobre as comorbidades, seis pacientes eram hipertensos, dois eram transplantados renais (CBM moderada), dois estavam tratando hanseníase reacional (uma CBM moderada e uma CBM grave), um era coinfestado com o vírus da hepatite B e um era diabético, enquanto dois pacientes não apresentaram comorbidades detectadas. Tivemos 10 pacientes apresentando comorbidades, observando mais de uma comorbidade em dois deles.

Dos 12 pacientes acompanhados no INI, 9 obtiveram cura, sendo que, 3 deles utilizaram apenas fármacos antifúngicos, 2 foram submetidos unicamente a procedimento cirúrgico, 3 utilizaram fármacos antifúngicos associados a métodos físicos (criocirurgia e/ou cirurgia) e 1 foi submetido à cirurgia e duas sessões de criocirurgia. A duração do tratamento, considerando apenas os seis pacientes que usaram fármacos antifúngicos (ITZ sozinho ou em associação), variou de 1 a 87 meses (mediana = 9 meses). Os dados sobre a CIM dos antifúngicos *in vitro* e tratamento para CBM estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Identificação molecular do fungo, CIMs dos fármacos utilizados, tratamento realizado e desfecho clínico dos 12 pacientes acompanhados no INI.

Paciente	Isolados	Espécies	CIM (µg/mL)			Tratamento (meses)				Duração (meses)
			ITZ	FLZ	TRB	Inicial	Critério de mudança	Subsequente	Desfecho	
3	19571	<i>F. pedrosoi</i>	0,5	8	0,12	ITZ 200 mg/dia (8)	Melhora lenta	ITZ 400 mg/dia (5) ITZ 400 mg/dia + FLZ 200 mg/dia (60) + Criocirurgia (13 sessões) ITZ 400 mg/dia + TRB 250 mg/dia (6) ITZ 400 mg/dia + TRB 500 mg/dia (12)	Melhora lenta	91
	19889		1	16	0,12				Melhora lenta	
4	25543	<i>F. monophora</i>	0,5	16	0,12	ITZ 400 mg/dia + FLZ 200 mg/dia (18)	Melhora	ITZ 200 mg/dia + FLZ 200 mg/dia (4)	Cura	22
5	25811	<i>F. monophora</i>	0,25	8	0,06	ITZ 400 mg/dia (6 meses antes do INI)	Sem melhora (AVC não relacionado à CBM)	ITZ 200 mg/dia	Transferido para outra unidade de saúde (AVE)	-
6	28479	<i>F. nubica</i>	0,25	16	0,12	Cirurgia		-	Cura	-
7	32999	<i>F. monophora</i>	0,25	8	0,06	Cirurgia		-	Cura	-
8	33420	<i>F. monophora</i>	1	8	0,06	ITZ 200 mg/dia (4,5)	Lesão única em imunossuprimido	Cirurgia	Cura	5
9	34113	<i>F. nubica</i>	1	32	0,12	ITZ 200 mg/dia (6)	Melhora lenta	Criocirurgia (2 sessões)	Abandono	10
	34242		1	16	0,25					
11	35962	<i>F. monophora</i>	0,5	16	0,25	Cirurgia	Lesão em imunossuprimido	Criocirurgia (2 sessões)	Cura	17
	36831		1	16	0,06					
12	36134	<i>F. monophora</i>	0,5	8	0,12	ITZ 300 mg/dia			Cura	2
15	38833	<i>F. monophora</i>	1	16	0,12	ITZ 200 mg/dia (3)	<i>Diabetes mellitus</i> descontrolada	Criocirurgia (18 sessões) Cirurgia	Cura	13
16	41080	<i>F. monophora</i>	0,5	16	0,12	ITZ 300 mg/dia			Cura	1
17	48262	<i>F. nubica</i>	1	8	0,015	ITZ 400 mg/dia + TRB 250 mg/dia	Melhora lenta	Criocirurgia Cirurgia	Cura	87

CIM: Concentração inibitória mínima, ITZ: itraconazol, FLZ: fluconazol, TRB: terbinafina, AVE: acidente vascular encefálico, CBM: cromoblastomicose.

Quanto à gravidade da doença, dos nove pacientes infectados por *F. monophora*, temos informações clínicas de oito, sendo cinco caracterizados com a forma moderada da doença e três com a forma grave. Foi observada CBM moderada e grave também em pacientes infectados com *F. nubica*, e CBM moderada foi observada na paciente infectada com *F. pedrosoi* com dados clínicos disponíveis. O único caso de CBM disseminada neste estudo foi observada em um paciente infectado com *F. monophora*, embora tenham sido observadas apenas lesões cutâneas neste paciente. Um dos pacientes infectados com *F. monophora* apresentou 32 anos de evolução de CBM. O único caso com lesão tumoral foi observado em um paciente infectado com *F. monophora*. Além disso, três pacientes infectados com *F. monophora* apresentavam comorbidades (um transplantado e dois com hanseníase reacional). Dos pacientes infectados com CBM por *F. monophora*, sete foram curados e um não temos informação do desfecho. Com relação aos cinco pacientes que não temos os dados clínicos, três foram infectados com *F. pedrosoi*, um com *F. monophora* e um com *F. nubica*. Nenhum caso de comprometimento cerebral foi observado neste estudo.

Quanto à localização geográfica, é importante ressaltar que todos os pacientes nascidos e criados no estado do Rio de Janeiro (3/12) foram infectados com *F. monophora* e todos os pacientes infectados com *F. pedrosoi* nasceram fora do estado do Rio de Janeiro. Além disso, dois casos de *F. pedrosoi* sem dados clínicos disponíveis (casos 13 e 14, Tabela 4) foram diagnosticados em pacientes da região amazônica brasileira. Foi possível determinar o provável local de infecção para nove pacientes, sendo oito deles no Rio de Janeiro e uma paciente se infectou no estado do Espírito Santo. Dos outros três pacientes com dados documentados, não foi possível obter essa informação. Dentre os pacientes infectados no Rio de Janeiro, seis foram por *F. monophora* (75%) e dois por *F. nubica* (25%).

5.6 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DA MELANINA

A adição ao meio de cultivo PDA de 8 mg/L e 16 mg/L do inibidor de biossíntese de melanina DHN, triciclazol, modificou a coloração da colônia, de verde-escuro a negro, para um tom alaranjado (Figura 16). Não houve diferença no crescimento dos isolados quando incubados em temperaturas de 30°C e 35°C (Figura 17).

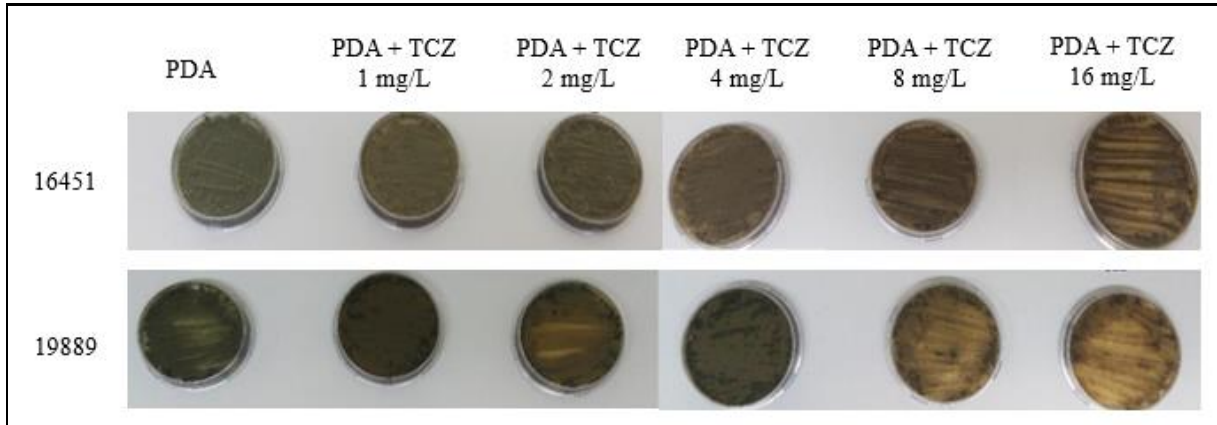


Figura 16: Crescimento de *Fonsecaea* spp. em ágar batata dextrose (PDA) com diferentes concentrações de triciclazol (TCZ). Fonte: Rowena A. Coelho.

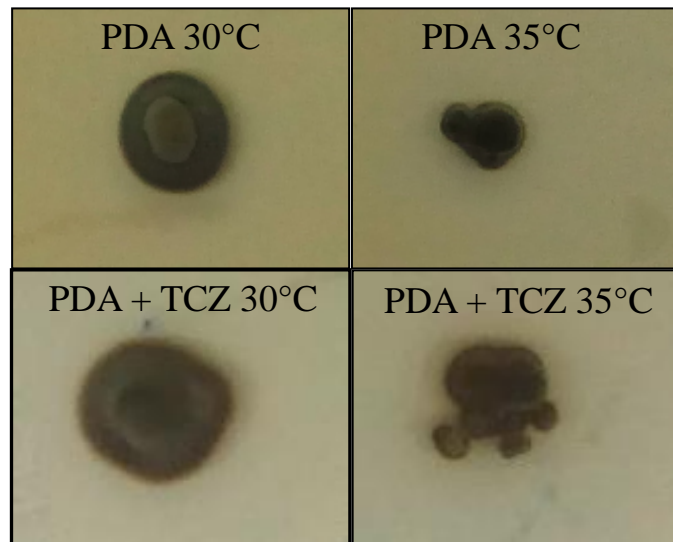


Figura 17: Crescimento de *Fonsecaea pedrosoi* (isolado 16751-1) na presença de triciclazol (TCZ) 8 mg/L em ágar batata dextrose (PDA). Fonte: Rowena A. Coelho.

5.7 EFEITOS DA MELANINA NA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA

A influência da melanina na susceptibilidade aos fármacos AMB, FLZ, 5-FC e MFG foi analisada pela comparação da taxa de sobrevivência dos isolados no tempo zero, sem adição do fármaco, com a taxa de sobrevivência após 2 horas e 24 horas de incubação com o fármaco. Após análises, observamos que, na maioria dos isolados, a inibição da melanina não diminuiu a resistência do fungo aos antifúngicos (tabela 6). No isolado 34113 de *F. nubica*, a inibição da melanina melhorou a ação dos fármacos AMB, FLZ e 5-FC. O fármaco 5-FC

apresentou uma melhor atividade frente aos isolados com a melanina inibida, inibindo quatro, dos sete testados. Em contrapartida, a MFG não mostrou atividade em seis isolados (85,71%), para os quais houve uma diminuição da ação do fármaco após a inibição da melanina. Assim como o FLZ, em que para cinco isolados (71,43%) não melanizados, houve uma piora na ação desse fármaco. Observamos que em dois isolados (41080 e 16451) não houve diferença na resposta aos fármacos AMB e 5-FC, tanto na presença quanto na ausência da melanina fúngica. Os gráficos das taxas de sobrevivência dos isolados estão detalhados na figura 18.

Tabela 6: Influência da inibição da melanina na susceptibilidade aos antifúngicos.

Antifúngicos	Isolados (n=7)		
	Melhorou a ação do antifúngico	Piorou a ação do antifúngico	Indiferente
AMB	3	3	1
MFG	1	6	-
FLZ	2	5	-
5-FC	4	2	1

AMB: anfotericina B, MFG: micafungina, FLZ: fluconazol, 5-FC: flucitosina.

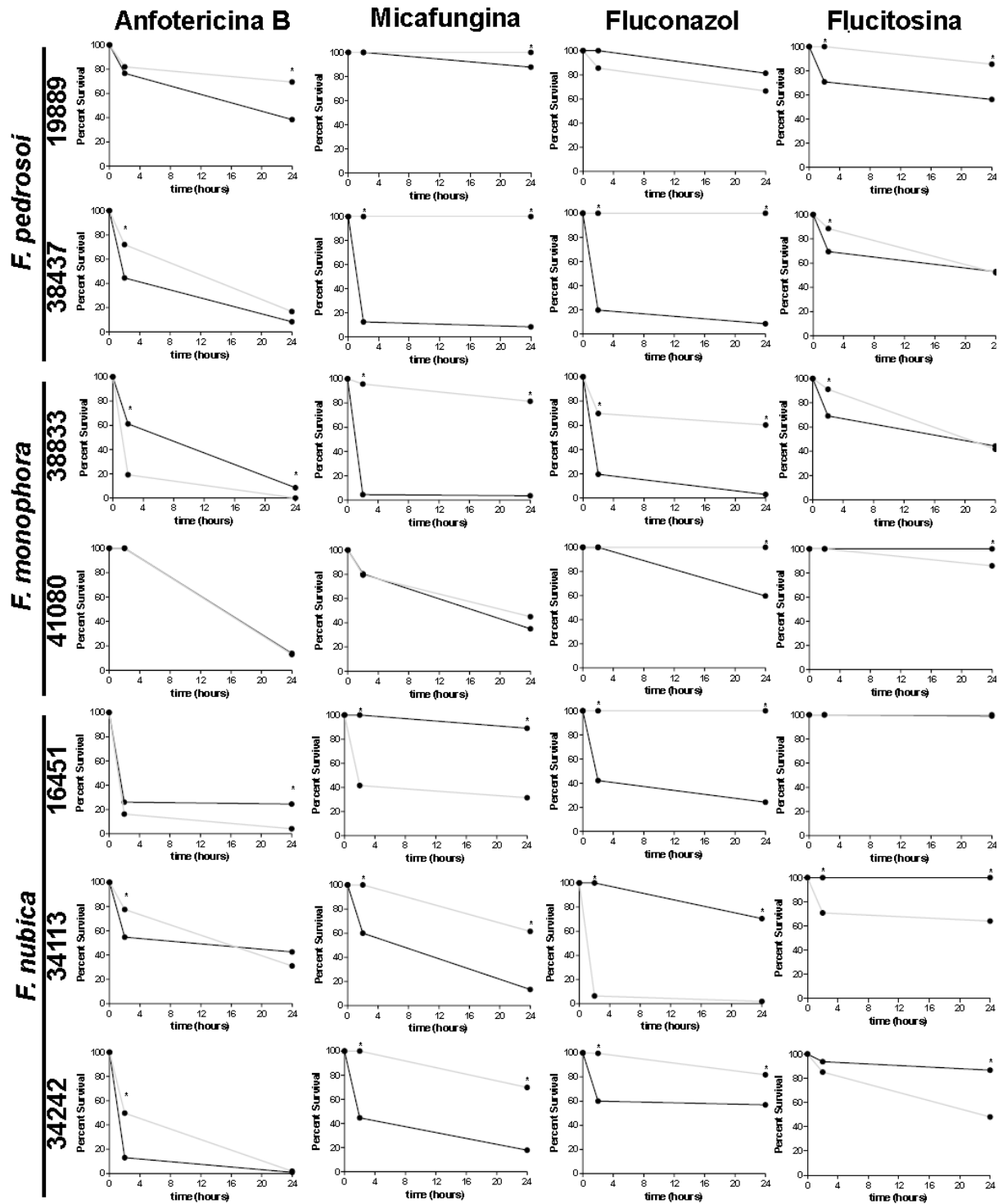


Figura 18: Gráficos da taxa de sobrevivência dos isolados testados frente aos fármacos anfotericina B, flucitosina, fluconazol e micafungina com a produção de melanina inibida. (----: melanizado, ----: não melanizado). * Indica diferença estatisticamente significativa.

6 DISCUSSÃO

Espécies patogênicas do gênero *Fonsecaea* se diferenciam apenas pela caracterização molecular, pois se apresentam muito semelhantes fenotipicamente. Todos os isolados clínicos desse estudo foram identificados fenotipicamente como *F. pedrosoi*. Entre as metodologias mais usadas para identificação molecular de agentes de CBM estão as técnicas de sequenciamento e análise das sequências do rADN da região ITS (LIM et al., 2011; DABOIT et al., 2013; TAMURA et al., 2013). Tal metodologia foi suficiente para caracterizar as espécies isoladas em nosso estudo, baseada no trabalho de Irinyi e colaboradores (2015) que enfatiza que as sequências com 99-100% de semelhança quando comparadas com as sequências depositadas na base de dados do ISHAM ITS indicam uma correta identificação molecular (IRINYI et al., 2015). Este nível de identificação molecular de isolados clínicos de um único centro é um mérito de relevância clínica.

Fonsecaea pedrosoi é a espécie predominante em climas tropicais úmidos da América do Sul, seguida de *F. monophora* (QUEIROZ-TELLES; SANTOS, 2013), predominante no sul da China (XI et al., 2009). Todas as quatro espécies de *Fonsecaea* que estão relacionadas à CBM já foram descritas no Brasil (GOMES et al., 2016). Dos 20 isolados de nosso estudo, observamos a predominância de *F. monophora* (50%), seguida de *F. pedrosoi* (25%) e *F. nubica* (25%). O estudo de Gomes e colaboradores (2016) revela que *F. pedrosoi* é a espécie predominante no Brasil (GOMES et al., 2016). Porém, nosso trabalho apresentou uma frequência maior de *F. monophora*, o que sugere que esta espécie seja mais comum no Rio de Janeiro. Então, seria necessário um estudo com um número maior de isolados provenientes de pacientes do estado do Rio de Janeiro para confirmar essa hipótese.

A CBM é conhecida por sua dificuldade no tratamento, por não existir um fármaco de escolha padrão e pela literatura relatar a frequente reincidência da doença após o tratamento, sendo assim, o estudo do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos torna-se necessário para um melhor conhecimento da terapia adequada. Contudo, os métodos utilizados para determinação da susceptibilidade *in vitro* ainda não trazem uma relação clara entre os seus resultados e a clínica dos pacientes (QUEIROZ-TELLES et al., 2009). Em geral, os valores de CIMs ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ costumam indicar uma potencial susceptibilidade na maioria dos fármacos usados no tratamento de infecções causadas por fungos demáceos (REVANKAR; SUTTON, 2010; DABOIT et al., 2014).

Nosso estudo encontrou elevados valores de CIM para AMB corroborando outros autores (BEDOUT; GÓMEZ; RESTREPO, 1997; RASAMOELINA et al., 2017). O tratamento com AMB sozinho ou combinado com 5-FC não é utilizado desde a introdução do ITZ durante a década de 1980. No passado, vários autores também recomendavam AMB intravenosa, intra-arterial ou intralesional, com sucesso limitado, além da frequente ocorrência de nefrotoxicidade, devido às suas características e ao tratamento prolongado (SAWAYA; BRIGGS; SCHNERMANN, 1995; TONIN et al., 2017). Além disso, com a interrupção do fármaco, a infecção quase sempre era reativada (QUEIROZ-TELLES; SANTOS, 2013; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Todos esses fatores dificultam seu uso na terapia da CBM.

No estudo realizado por Najafzadeh e colaboradores (2010a), foi sugerido que as equinocandinas têm um papel limitado no tratamento da CBM devido aos altos valores de CEMs. Resultado semelhante foi encontrado no nosso trabalho sendo compatível com outros estudos (NAJAFZADEH et al., 2010a; BADALI et al., 2013). Por outro lado, o estudo de Del Poeta e colaboradores (1997) utilizou o método de macrodiluição em caldo proposto pelo NCCLS para testar o antibiótico pneumocandina L-743,872 *in vitro* e observou atividade contra *Fonsecaea* spp. A CAS é um derivado semissintético hidrossolúvel da pneumocandina (DEL POETA; SCHELL; PERFECT, 1997). A diferença de atividade dessas substâncias contra isolados de *Fonsecaea* pode estar relacionada a mudanças na estrutura química desses compostos.

Nosso estudo apresentou baixos valores de CIM (CIM₉₀ 0,50 µg/mL) para o CTZ, assim como observado em outros trabalhos (BEDOUT; GÓMEZ; RESTREPO, 1997; ANDRADE et al., 2004; DABOIT et al., 2014). Contudo, esse fármaco não é usado sistemicamente por existirem outros fármacos que garantem o mesmo efeito sendo melhor tolerados. O uso de CTZ na formulação oral foi contraindicado, pois os dados sobre eficácia são limitados. Além disso, possui interação com diversos fármacos de uso rotineiro e causa lesões hepáticas graves (ANVISA, 2013b; EMA, 2013).

O ITZ é considerado o tratamento para CBM mais usado até o momento (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Existem trabalhos na literatura que demonstram que o ITZ apresenta baixas CIMs frente a isolados de *Fonsecaea* spp. (BEDOUT; GÓMEZ; RESTREPO, 1997; NAJAFZADEH et al., 2010a; DABOIT et al., 2014). No nosso estudo os valores de CIM encontrados para este fármaco foram superiores às CIMs dos estudos anteriores (CIM₉₀ 1 µg/mL), porém considerando que valores de CIMs ≤ 1 µg/mL costumam indicar susceptibilidade do isolado ao agente antifúngico (REVANKAR; SUTTON, 2010), podemos

sugerir que o ITZ apresenta atividade frente aos isolados de *Fonsecaea* spp. utilizados no presente estudo.

Os valores de CIM encontrados para 5-FC e FLZ (CIM₉₀ 16 µg/mL) foram compatíveis com outros estudos, mostrando que esses fármacos não são totalmente adequados ao tratamento da CBM. Apesar do FLZ ser considerado terapia de escolha para o tratamento de algumas micoses, a resposta desse fármaco é inferior ao ITZ quando administrado no tratamento de doenças como a histoplasmose, blastomicose, esporotricose e CBM (BEDOUT; GÓMEZ; RESTREPO, 1997; LACAZ et al., 2002; ANDRADE et al., 2004; NAJAFZADEH et al., 2010a). Quanto à 5-FC, segundo alguns estudos, apesar do seu uso em meados da década de 1960 marcar o início da quimioterapia para CBM, sendo uma droga bastante utilizada na época, observou-se mais tarde que a atividade desse fármaco pareceu diminuir após alguns meses, sem melhora mesmo após aumento da dosagem (BONIFAZ; PAREDES-SOLÍS; SAÚL, 2004; QUEIROZ-TELLES et al., 2009). Além disso, *F. pedrosoi* é capaz de facilmente desenvolver resistência *in vitro* à 5-FC (BOPP, 1976; RIPPON, 1988; RESTREPO, 1994; ATTAPATTU, 1997; BONIFAZ; PAREDES-SOLÍS; SAÚL, 2004).

Vários estudos relatam a susceptibilidade dos isolados de *Fonsecaea* spp. frente à TRB, revelando sua potente ação contra vários fungos filamentosos e boa resposta no tratamento de pacientes com CBM, podendo apresentar até 80% de taxa de cura (ESTERRE et al., 1996; MCGINNIS; PASARELL, 1998; ANDRADE et al., 2004; DABOIT et al., 2014). Esse fármaco apresenta um potente efeito antifibrótico em lesões recentes (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006). Nossos resultados foram compatíveis com esses estudos, apresentando baixos valores de CIM (CIM₉₀ 0,25 µg/mL) para este fármaco. A TRB possui alta atividade *in vitro* não só contra agentes de CBM, mas também contra outros fungos, como *Sporothrix schenckii*, dermatófitos, *Syncephalastrum racemosum*, *Arthrographis kalrae*, *Candida dubliniensis*, dentre outros. Nestes fungos, os valores de CIM₉₀ são iguais ou inferiores a 0,25 µg/mL e apresentam uma melhor resposta *in vitro* do que os azóis (ALMEIDA-PAES et al., 2016b). Quando comparada com os azóis, a TRB tem pouca afinidade para o sistema enzimático do citocromo P450, resultando em menor interação com outros fármacos (SCHMITT et al., 2013). No entanto, algumas interações potenciais de TRB com certas substâncias são conhecidas, incluindo substâncias do grupo de antidepressivos/antipsicóticos e algumas com efeitos cardiovasculares, devendo ser monitorada a resposta clínica e potenciais efeitos adversos (DÜRRBECK; NENOFF, 2016).

Segundo Lima e colaboradores (2016), o fármaco VRZ apresenta atividade frente aos agentes de CBM, incluindo as espécies de *Fonsecaea*. Encontramos baixos valores de CIM (CIM₉₀ 0,25 µg/mL) para esse fármaco, compatíveis com estudos anteriores que demonstram que o VRZ tem eficácia no tratamento dessa doença. Contudo, além do seu alto custo (KOO; KLOMPAS; MARTY, 2010), a prescrição de VRZ deve ser feita com precauções, por apresentar efeitos adversos de fototoxicidade e risco de carcinoma cutâneo se o tratamento for mantido por um período prolongado (EPAULARD et al., 2011; WILLIAMS et al., 2014).

PSZ, VRZ e RVZ representam a nova geração de fármacos triazólicos, possuem um amplo espectro de atividade e perfil farmacocinético favorável (BLYTH, 2011). A literatura demonstra uma melhor atividade *in vitro* do PSZ em relação ao ITZ frente a isolados clínicos de *Fonsecaea* spp. (NAJAFZADEH et al., 2010a) e nossos resultados foram similares aos desse estudo. Porém, pelo seu elevado custo, torna-se inviável administrá-lo por longos períodos, como ocorre no tratamento da CBM.

González e colaboradores (2005) relatam atividade *in vitro* do fármaco RVZ frente a isolados de *F. pedrosoi* com variação de CIMs entre 0,125-0,5 µg/mL, utilizando a metodologia da macrodiluição em caldo segundo protocolo M38-A do CLSI (GONZÁLEZ et al., 2005). Nosso estudo, apesar de utilizar outra metodologia, apresentou valores de CIM ≤ 1 µg/mL para o mesmo fármaco frente a isolados clínicos de *Fonsecaea* spp. Este fármaco apresenta espectro de ação semelhante ao do VRZ e do PSZ, segundo estudo de Bergold e Georgiadis (2004), além disso é bem tolerado sem efeitos adversos graves observados. Não apresentou toxicidade durante estudos em animais, sugerindo mais uma opção de tratamento futura da CBM (PEYTON; GALLAGHER; HASHEMZADEH, 2015).

Existem poucos trabalhos que comparam a susceptibilidade *in vitro* entre isolados clínicos de *Fonsecaea* spp. O estudo de Najafzadeh e colaboradores (2010) testou 55 isolados de *Fonsecaea* spp. e não encontrou diferenças significativas na atividade de oito fármacos antifúngicos (AMB, FLZ, ITZ, VRZ, PSZ, CAS, anidulafungina e isavuconazol) frente às espécies *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica* (NAJAFZADEH et al., 2010a). Em nosso estudo verificamos que houve diferença entre as espécies *F. monophora* e *F. pedrosoi* (p=0,0447), em que a primeira apresentou valores de CIM mais elevados para AMB. As espécies *F. monophora* e *F. nubica* (p=0,0009) apresentaram valores de CEM mais elevados para o fármaco MFG quando comparadas à espécie *F. pedrosoi*. Contudo, o trabalho de Najafzadeh (2010) não testou o fármaco MFG, havendo discrepância apenas no que se refere

à AMB. Os outros fármacos testados não apresentaram diferenças significantes nos dois estudos.

Os pacientes com CBM ainda são um verdadeiro desafio terapêutico para os clínicos devido à natureza recalcitrante da doença, especialmente nas formas clínicas mais graves (QUEIROZ-TELLES et al., 2009). Observamos que, mesmo após o término do estudo de Mouchalouat e colaboradores (2011), o INI/Fiocruz segue apresentando um perfil clássico da CBM: predominância no sexo masculino, profissão ligada ao manuseio da terra e doença de evolução crônica. Apesar de nosso estudo ter sido realizado no Rio de Janeiro, por ser um centro de referência local para dermatologia infecciosa e devido a aspectos comuns migratórios no Brasil, alguns pacientes eram oriundos de outras regiões do país. O INI é o principal centro estadual de referência para micoses profundas como esporotricose, micetoma e CBM. No período estudado, 1999 a 2015, encontramos registro de 28 casos de CBM atendidos no INI, dos quais 17 estão incluídos no presente estudo. Os demais casos não tiveram isolamento do agente em cultivo, sendo o diagnóstico confirmado somente pela observação de corpos muriformes no exame micológico direto. Além disso, alguns casos com isolamento em cultivo se perderam por motivo de contaminação ou perda de viabilidade desses isolados ao longo dos anos. Cabe ressaltar que Mouchalouat e colaboradores (2011) avaliaram clinicamente 7 dos 17 casos incluídos neste estudo. Na época, os isolados foram caracterizados molecularmente como *F. pedrosoi*, concomitante a isso, ocorria o estudo taxonômico que reformulou o gênero *Fonsecaea*. Em nosso estudo, esses isolados foram reidentificados molecularmente segundo os avanços na taxonomia do gênero *Fonsecaea* ocorrido nos últimos anos (NAJAFZADEH et al., 2010b, 2011b; SUN et al., 2012; DE AZEVEDO et al., 2015).

De acordo com os critérios de consenso baseados na revisão de Queiroz-Telles e colaboradores (2017), nenhum paciente foi considerado com a forma leve da doença. Todos os casos foram classificados como moderados ou graves, com predomínio nos membros inferiores e as lesões classificadas como verrucosas. Apesar de não ter ocorrido nenhum caso de CBM leve, dos 12 pacientes que temos informações clínicas disponíveis em prontuário (12/17), observamos cura em 75% dos casos.

A respeito das comorbidades, alguns trabalhos relatam *Fonsecaea monophora* causando infecção em pacientes imunodeprimidos, com transplante de órgãos sólidos, diabetes mellitus e infecção por HIV (SURASH et al., 2005; BAGLA; LOEFFELHOLZ; BLANTON, 2016). O estudo de Cleinman e colaboradores (2017) descreve o caso de uma

paciente transplantada renal que apresentou infecção do trato respiratório por *F. monophora* (CLEINMAN et al., 2017). O estudo de Santos e colaboradores (SANTOS et al., 2017) relata a ocorrência de feohifomicose e CBM em pacientes transplantados renais, com apenas quatro casos de CBM classificados na forma leve (três casos por *F. pedrosoi* e um por *F. monophora*) que foram tratados com terapia antifúngica com sucesso, desfecho semelhante ao nosso estudo. No trabalho de Mouchalouat e colaboradores (2011), assim como no presente estudo, as comorbidades não influenciaram nem a evolução, nem a forma clínica da doença, pois esses pacientes foram diagnosticados precocemente e tratados com sucesso. As pacientes transplantadas renais (2/12), uma infectada por *F. monophora* e outra por *F. nubica* foram curadas por uma abordagem terapêutica com exérese cirúrgica, já que as lesões iniciais eram pequenas e essas pacientes não podiam fazer uso de fármacos antifúngicos. Outra comorbidade presente em nosso estudo foi a hanseníase reacional. Nos casos com essa comorbidade (2/12), em que o agente era *F. monophora*, os pacientes foram curados por exérese cirúrgica. Estes casos demonstram um viés positivo possivelmente influenciado pela inserção prévia dos pacientes no sistema público de saúde e por uma conduta precoce devido ao potencial de evolução desfavorável dos casos. Desta forma, assim como nos estudos anteriores (SURASH et al., 2005; BAGLA; LOEFFELHOLZ; BLANTON, 2016; CLEINMAN et al., 2017; SANTOS et al., 2017), *F. monophora* predominou nos pacientes apresentando comorbidades.

Segundo uma revisão recente sobre CBM, dentre as quatro espécies que causam doença em humanos, *F. monophora* e *F. pugnacius* mostram um significante neurotropismo, sendo a primeira mais relacionada à feohifomicose e com caráter oportunístico. *F. pedrosoi* e *F. nubica* estão relacionadas exclusivamente à CBM (DABOIT et al., 2013; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). A literatura relata que *F. monophora* tem aspecto clínico distinto em relação às outras espécies, aparecendo como fungo oportunista geral causando, além de CBM cutânea e subcutânea, infecções em órgãos internos, como cérebro (SURASH et al., 2005; ZHANG et al., 2009a). Contudo, é relatado que este agente tem uma melhor resposta ao tratamento em comparação com *F. pedrosoi* (BONIFAZ; PAREDES-SOLÍS; SAÚL, 2004; ZHANG et al., 2009a; CRIADO et al., 2011). A maioria dos casos de CBM por *F. monophora* foi tratada com sucesso, corroborando os estudos anteriores. Além disso, não houve acometimento cerebral em nosso estudo, mesmo nos casos com longo tempo de evolução da CBM.

Comparando o tratamento dos pacientes com a resposta *in vitro* dos isolados, não foi possível observar relações entre a resposta do tratamento e a susceptibilidade antifúngica dos isolados obtidos desses pacientes. O ITZ foi o fármaco utilizado em quase todos os casos, porque é distribuído gratuitamente no INI/Fiocruz. No entanto, a maioria dos pacientes apresentou uma leve melhora com este fármaco, independente da CIM para ITZ observada para os isolados. É comum o desenvolvimento de fibrose em lesões de CBM (URIBE et al., 1989) e isso dificulta a ação dos fármacos, pois impede a penetração dos mesmos (YANG et al., 2012). Além disso, existem fatores que limitam a ação do fármaco no organismo, já que o ITZ precisa de um ambiente gástrico ácido para ser devidamente absorvido (BAE et al., 2011). Uma diminuição da produção de suco gástrico pode resultar em pH mais básico do estômago, reduzindo assim a biodisponibilidade desse fármaco e, portanto, sua atividade (HOF, 2010; ALLEGRA et al., 2017). Em 66,7% dos casos, os procedimentos cirúrgicos para remover as lesões foram necessários para obter a cura nos pacientes. Quando diagnosticadas precocemente, as lesões iniciais de CBM pequenas e não disseminadas podem ser removidas cirurgicamente, do contrário, longos períodos de terapia antifúngica sistêmica isolada ou em combinação com vários métodos físicos é a regra para muitos pacientes (BONIFAZ; CARRASCO-GERARD; SAUL, 2001; QUEIROZ-TELLES; SANTOS, 2012, 2013). Nos casos em que houve um diagnóstico precoce (16,7%), a cirurgia curou os pacientes sendo desnecessário o uso de fármacos antifúngicos. Dos fármacos que apresentaram melhor atividade *in vitro* nesse estudo (TRB e VRZ), apenas dois casos fizeram uso da TRB concomitante ao ITZ. Já o VRZ não foi administrado em nenhum dos casos, pois apesar de seu uso ser recomendado por muitos autores, como sendo um fármaco promissor e seguro no tratamento da CBM (CRIADO et al., 2011; YANG et al., 2012), deve-se considerar o risco de carcinoma cutâneo na prescrição de VRZ por longos períodos (EPAULARD et al., 2011; WILLIAMS et al., 2014) e seu alto custo.

Alguns estudos revelam que, em determinados casos de CBM, a melhor estratégia em terapia seria a combinação de dois fármacos baseada nos resultados de testes de susceptibilidade anteriores (POIRRIEZ et al., 2000). Algumas dessas combinações de fármacos seriam AMB e 5-FC (QUEIROZ-TELLES et al., 2009) ou ITZ e TRB (GUPTA; TABORDA; SANZOVO, 2002). Nosso trabalho mostrou uma interação sinérgica entre os fármacos AMB e 5-FC em três isolados de *Fonsecaea monophora*. É interessante que ambos os fármacos, que apresentaram CIMs elevadas quando usados isoladamente, mostraram sinergismo quando combinados. Nesse sentido, o uso de combinações de agentes antifúngicos

em situações nas quais não há resposta à terapia farmacológica quando usado sozinho ou em casos de alta gravidade, que geralmente ocorrem nesta micose, pode ser uma opção para melhorar a eficácia de cada antifúngico e obter alta eficiência usando baixas doses (NAJAFZADEH et al., 2010a). Nessa combinação ocorrem dois mecanismos distintos intensificando a ação antifúngica: AMB liga-se ao ergosterol da membrana do fungo formando poros e a 5-FC atua inibindo a síntese de ácidos nucleicos. Contudo, o uso dessa combinação deve ser cauteloso pela nefrotoxicidade da AMB, necessidade de importação da 5-FC, além de seus possíveis sérios eventos adversos (TONIN et al., 2017; YAMAUTI et al., 2017).

A combinação entre ITZ e TRB apresentou interação indiferente frente aos isolados de *Fonsecaea* spp. Apenas um estudo, de Zhang e colaboradores (2009), encontrou efeito sinérgico em 12 de 18 isolados de *F. monophora* testados com essa combinação (ZHANG et al., 2009b). Porém, nossos resultados são compatíveis com a maioria dos trabalhos que estudaram essa interação (GUPTA; TABORDA; SANZOVO, 2002; YU et al., 2008; DABOIT et al., 2013). A combinação dos fármacos ITZ e TRB é utilizada com frequência em pacientes que apresentam doença refratária. No estudo de Gupta e colaboradores (2002), em alguns casos de CBM nos quais se administrou esses fármacos em conjunto por um longo período e houve falha, eles optaram pelo uso de ambos os fármacos em semanas alternadas, havendo resgate de alguns casos (GUPTA; TABORDA; SANZOVO, 2002).

A combinação entre ITZ e CAS apresentou interação indiferente frente aos isolados deste estudo. O estudo de Li e colaboradores (2014) encontrou efeito sinérgico em 100% dos isolados de *Phialophora verrucosa*, outro agente de CBM. Por este motivo esta combinação de fármacos foi testada em nosso estudo. Apesar da fraca atividade *in vitro* das equinocandinas frente aos isolados de *P. verrucosa*, quando combinou-se a CAS com ITZ houve um aumento da atividade desse fármaco (LI; WAN; LI, 2014), o que parece não ocorrer com *Fonsecaea* spp.

Existe ainda o estudo de Meletiadis e colaboradores (2010), que utiliza um outro método menos rigoroso para definição de interação entre fármacos, baseado em estudos de correlação *in vivo* e *in vitro* que validam esse critério, em que se considera sinergismo em fungos filamentosos um ICIF menor que 1 e antagonismo, ICIF maior que 1,25. As interações indiferentes são aquelas com ICIF entre 1 e 1,25 (MELETIADIS et al., 2010). Utilizando esse critério, temos que a combinação ITZ e TRB apresentou sinergismo em quatro isolados de *F. monophora*. O mecanismo dessa combinação de fármacos é potente, pois inibe em duas

etapas distintas a via da síntese do ergosterol. A TRB age inibindo a enzima esqualeno epoxidase, enquanto o ITZ atua sobre as enzimas do citocromo P450, a lanosterol 14- α -demetilase. A combinação 5-FC e AMB apresentou sinergismo em nove isolados (seis de *F. monophora*, dois de *F. pedrosoi* e um de *F. nubica*), e a combinação ITZ e CAS apresentou sinergismo em seis isolados (três de *F. monophora*, dois de *F. nubica* e um de *F. pedrosoi*). Esses fármacos agem em dois alvos distintos: parede celular e síntese de ergosterol, alterando a permeabilidade e a viabilidade fúngica. Por outro lado, a interação antagônica também foi observada utilizando o mesmo critério (MELETIADIS et al., 2010). Na combinação ITZ e TRB, sete isolados apresentaram antagonismo (três de *F. pedrosoi*, dois de *F. monophora* e dois de *F. nubica*). Na 5-FC e AMB, três isolados apresentaram antagonismo (um de cada espécie) e na combinação ITZ e CAS, nove isolados (quatro de *F. monophora*, quatro de *F. pedrosoi* e um de *F. nubica*). Esses resultados melhorariam a interpretação da interação entre os fármacos e seria interessante correlacionar os dados *in vitro* em paralelo à terapia antifúngica utilizada nos pacientes. Dois pacientes deste estudo fizeram uso da combinação ITZ e TRB, contudo no teste de susceptibilidade *in vitro* os isolados foram classificados, de acordo com o critério de Meletiadis e colaboradores (2010), como indiferentes frente a essa combinação. Em um dos casos não foi possível obter o desfecho, pois o paciente abandonou o tratamento, já o segundo paciente obteve cura associando a combinação dos fármacos e métodos físicos de tratamento. Estudos futuros são necessários para correlacionar dados clínicos e laboratoriais das outras combinações de antifúngicos testadas.

Uma limitação deste estudo é a determinação da susceptibilidade *in vitro* aos fármacos antifúngicos utilizando conídios como inóculo e não células muriformes, que são as estruturas presentes em parasitismo. Existem alguns estudos que mostram que as células muriformes são altamente resistentes e podem responder de forma diferente à exposição ao fármaco, porém é muito difícil manter a cultura dessas células *in vitro* (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Na literatura, trabalhos que testam a susceptibilidade *in vitro* aos fármacos utilizam conídios e hifas como inóculo, assim como foi realizado em nosso estudo, já que é a técnica mais viável e reprodutível. Outra importante limitação é o baixo número de isolados analisados. Isto é intrínseco a doenças raras, como a CBM no Sudeste do Brasil.

Alguns fungos patogênicos produtores de melanina se apresentam mais susceptíveis aos fármacos quando a produção desse pigmento é inibida (GÓMEZ; NOSANCHUK, 2003; ALP, 2010). O estudo de Almeida-Paes e colaboradores (2016) demonstrou que na presença de inibidores de melanina foi observado um aumento da susceptibilidade à TRB em isolados

de *Sporothrix brasiliensis* e *S. schenckii* (ALMEIDA-PAES et al., 2016a). Já o estudo de van Duin e colaboradores (2002), demonstrou que a melanização conferiu proteção aos isolados de *C. neoformans* e *H. capsulatum* frente aos fármacos AMB e CAS (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002).

As espécies de *Fonsecaea* produzem melanina, que é considerada um importante fator de virulência. O uso do inibidor triciclazol na biossíntese desse pigmento tem sido muito estudado (FRANZEN et al., 2006). Sendo assim, nossos ensaios envolvendo o uso dessa substância para inibir a produção da melanina em isolados de *Fonsecaea* spp. mostraram resultados compatíveis com o estudo de Franzen e colaboradores (2006), apresentando uma mudança na coloração do fungo após crescimento em meio contendo esse inibidor.

A inibição da via de biossíntese da melanina pelo triciclazol reduz a resistência do fungo contra macrófagos, favorecendo a fagocitose (BOCCA et al., 2006). A inibição desse pigmento em fungos patogênicos tem sido sugerida como alvo potencial para novos antifúngicos e poderia ser um tratamento alternativo para infecções fúngicas como a CBM (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; CUNHA et al., 2005). O estudo de Cunha (2008) demonstra que *F. pedrosoi* se apresenta mais susceptível aos antifúngicos ITZ, TRB e AMB com a melanina inibida, mas explica a dificuldade de alguns ensaios, como o teste da microdiluição em caldo do CLSI, em detectar essas diferenças na resistência aos fármacos de fungos melanizados ou não melanizados, sendo necessário utilizar experimentos de curva de morte para revelar essa maior susceptibilidade (CUNHA, 2008).

Em nosso estudo, adaptamos o ensaio aos experimentos de curva de morte e analisamos a resposta de sete isolados de *Fonsecaea* spp., melanizados e não melanizados, frente aos fármacos AMB, 5-FC, FLZ e MFG, os quais apresentaram baixa eficácia contra os isolados de *Fonsecaea* sem inibição de melanina. Observamos que a inibição da melanina melhorou a ação de alguns antifúngicos em alguns isolados, mas não houve homogeneidade nos resultados encontrados. Os dados analisados apontam uma melhora na ação do fármaco 5-FC em fungos não melanizados quando comparado aos outros. Esse fármaco inibe a síntese de ácidos nucleicos sendo necessário atingir o interior da célula. A célula tratada com triciclazol sofre alterações morfológicas na parede celular, ficando mais susceptível à lise, o que facilitaria a ação do fármaco.

Por outro lado, alguns isolados apresentaram maior crescimento quando expostos aos fármacos, sugerindo que a susceptibilidade de fungos não melanizados seja isolado-dependente. Apenas um isolado de *F. nubica* (34113) se mostrou mais susceptível aos

fármacos com a melanina inibida, enquanto os outros variaram em melhora ou piora da ação dependendo do fármaco testado. O estudo de Sun e colaboradores (2011) demonstrou que o teste de susceptibilidade de três mutantes de melanina de *F. monophora* de um caso de CBM (dois mutantes albinos, um dos quais produziu melanina secretada e outro deficiente em melanina, e um mutante com melanina associada à parede celular e secretada) a oito fármacos, dentre poliênicos e azólicos, não mostrou aumento consistente da atividade antifúngica *in vitro* (SUN et al., 2011). Contudo, o estudo de Cunha (2008) mostrou um aumento da susceptibilidade de cinco isolados de *F. pedrosoi* não melanizados aos antifúngicos AMB, ITZ e TRB, adicionando o dobro da concentração de triciclazol usada em nosso estudo. Seria interessante realizar estudos futuros com maiores concentrações desse inibidor de melanina a fim de avaliar se o aumento da susceptibilidade aos fármacos é dependente da concentração do inibidor. Embora a melanina esteja associada à virulência e ao aumento da resistência do fungo a fatores de estresse, a presença de melanina intacta na parede celular não parece ser a razão pela qual *Fonsecaea* spp. apresenta CIMs elevadas frente a esses antifúngicos importantes na prática clínica. Futuros estudos bioquímicos e genéticos de espécies de *Fonsecaea* e da via de biossíntese de melanina ajudarão a determinar os processos fisiológicos envolvidos na melanização e agregar o papel da melanina na patogênese fúngica.

Em resumo, este estudo demonstrou que TRB e VRZ apresentaram uma melhor atividade *in vitro* contra *Fonsecaea* spp., enquanto que AMB, FLZ e equinocandinas desempenharam um papel limitado no tratamento dessa doença devido a suas CIMs relativamente elevadas. No entanto, pelo menos dois desses fármacos, com elevados valores de CIM isoladamente, apresentaram sinergismo *in vitro* quando usados em combinação, tendo uma melhor atividade contra os mesmos isolados.

Os resultados observados em nosso trabalho trazem perspectivas de futuros estudos de acompanhamento clínico, tratamento e desfecho de pacientes com CBM no Rio de Janeiro, assim como a determinação da susceptibilidade *in vitro* aos fármacos antifúngicos e novos compostos com ação fungicida, principalmente em fungos melanizados.

7 CONCLUSÕES

- *Fonsecaea monophora*, seguida das espécies *F. nubica* e *F. pedrosoi* foram caracterizadas molecularmente, sendo as espécies mais frequentemente isoladas de pacientes com CBM acompanhados no INI entre 1999 e 2015. Nestes pacientes, a associação de métodos físicos de tratamento, juntamente com o itraconazol foi fundamental para a cura completa da maioria dos casos estudados, já que o itraconazol, isoladamente, foi ineficiente. Contudo, não foi possível detectar uma correlação entre a resposta ao tratamento dos pacientes e o perfil de susceptibilidade antifúngica *in vitro* ao itraconazol das espécies estudadas.
- Os fármacos terbinafina e voriconazol apresentaram melhor atividade *in vitro* frente aos isolados de *Fonsecaea* spp. do presente estudo, enquanto os fármacos anfotericina B, fluconazol, flucitosina e as equinocandinas apresentaram atividade *in vitro* reduzida frente aos mesmos isolados. Contudo, quanto testados em combinação, os fármacos anfotericina B e flucitosina foram capazes de apresentar sinergismo *in vitro* frente a *F. monophora*. Além disso, a presença de melanina na parede celular não está relacionada aos elevados valores de CIM apresentados por anfotericina B, fluconazol, flucitosina e micafungina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABLIZ, P.; FUKUSHIMA, K.; TAKIZAWA, K.; NIEDA, N.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Rapid identification of the genus *Fonsecaea* by PCR with specific oligonucleotide primers. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 2, p. 873–876, 2003.
- AGARWAL, R.; SINGH, G.; GHOSH, A.; VERMA, K. K.; PANDEY, M.; XESS, I. Chromoblastomycosis in India: Review of 169 Cases. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005534, ago. 2017.
- AJELLO, L.; GEORG, L. K.; STEIGBIGEL, R. T.; WANG, C. J. K. A Case of Phaeohiphomycosis Caused by a New Species of *Phialophora*. **Mycologia**, v. 66, n. 3, p. 490, maio 1974.
- ALLEGRA, S.; FATIGUSO, G.; DE FRANZIA, S.; FAVATA, F.; PIRRO, E.; CARCIERI, C.; DE NICOLÒ, A.; CUSATO, J.; DI PERRI, G.; D'AVOLIO, A. Pharmacokinetic Evaluation of Oral Itraconazole for Antifungal Prophylaxis in Children. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 44, n. 11, p. 1083–1088, nov. 2017.
- ALMEIDA-PAES, R.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; BRITO-SANTOS, F.; ALMEIDA-SILVA, F.; OLIVEIRA, M. M. E.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Melanins Protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the Antifungal Effects of Terbinafine. **PloS One**, v. 11, n. 3, p. e0152796, 2016a.
- ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; ARAÚJO, G. de S.; DE OLIVEIRA, M. M. E.; GERFEN, G. J.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Biosynthesis and Functions of a Melanoid Pigment Produced by Species of the *Sporothrix* Complex in the Presence of L-Tyrosine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8623–8630, dez. 2012.
- ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. M. E.; FREITAS, D. F. S.; VALLE, A. C. F. do; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Refractory Sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Humans Appears to Be Unrelated to in Vivo Resistance. **Medical Mycology**, 22 out. 2016b.
- ALP, S. [Melanin and its role on the virulence of *Cryptococcus neoformans*]. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 44, n. 3, p. 519–526, jul. 2010.
- ALVIANO, D. S.; FRANZEN, A. J.; TRAVASSOS, L. R.; HOLANDINO, C.; ROZENTAL, S.; EJZEMBERG, R.; ALVIANO, C. S.; RODRIGUES, M. L. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* Induces Production of Human Antifungal Antibodies and Enhances the Antimicrobial Efficacy of Phagocytes. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 229–237, jan. 2004.
- AMEEN, M. Chromoblastomycosis: Clinical Presentation and Management. **Clinical and experimental dermatology**, v. 34, n. 8, p. 849–854, dez. 2009.
- AMEEN, M. Managing Chromoblastomycosis. **Tropical Doctor**, v. 40, n. 2, p. 65–67, abr. 2010.

ANDRADE, T. S.; CASTRO, L. G.; NUNES, R. S.; GIMENES, V. M.; CURY, A. E. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. **Mycoses**, v. 47, n. 5–6, p. 216–221, 2004.

ANTONELLO, V. S.; SILVA, M. C. A. da; CAMBRUZZI, E.; KLIEMANN, D. A.; SANTOS, B. R.; QUEIROZ-TELLES, F. Treatment of Severe Chromoblastomycosis with Itraconazole and 5-Flucytosine Association. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 6, p. 329–331, dez. 2010.

ANVISA. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde - Módulo 8: Detecção e identificação dos fungos de importância médica**, 2013a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5bec2d004e257546b098b3c09d49251b/M%C3%B3dulo+8+%E2%80%93+Detec%C3%A7%C3%A3o+e+identifica%C3%A7%C3%A3o+de+fungos+de+import%C3%A2ncia+m%C3%A9dicapdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 29 mar. 2016.

ANVISA. **Anvisa alerta para o risco de reações hepáticas graves associadas ao uso oral do cetoconazol**. Alerta SNVS/Anvisa/Nuwig/GFARM nº 08, 11 jul. 2013b. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/alerta-snvs-anvisa-nuwig-gfarm-n-08-de-7-de-novembro-de-2013/33868/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=en_US>. Acesso em: 18 out. 2017.

ATTAPATTU, M. C. Chromoblastomycosis--a Clinical and Mycological Study of 71 Cases from Sri Lanka. **Mycopathologia**, v. 137, n. 3, p. 145–151, 1997.

ATTILI, D. S.; DE HOOG, G. S.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. rDNA-RFLP and ITS1 Sequencing of Species of the Genus *Fonsecaea*, Agents of Chromoblastomycosis. **Medical Mycology**, v. 36, n. 4, p. 219–225, ago. 1998.

AZAD, K.; KHANNA, G.; CAPOOR, M. R.; GUPTA, S. *Cladophialophora carrionii*: An Aetiological Agent of Cutaneous Chromoblastomycosis from a Non-Endemic Area, North India: *Cladophialophora Carrionii*. **Mycoses**, v. 54, n. 4, p. e217–e219, jul. 2011.

AZEVEDO, C. M. P. S.; MARQUES, S. G.; SANTOS, D. W. C. L.; SILVA, R. R.; SILVA, N. F.; SANTOS, D. A.; RESENDE-STOIANOFF, M. A. Squamous Cell Carcinoma Derived From Chronic Chromoblastomycosis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 10, p. 1500–1504, 15 maio 2015.

BADALI, H.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; MOUSAVI, B.; ILLNAIT-ZARAGOZI, M. T.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, J. C.; DE HOOG, G. S.; MEIS, J. F. Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* and *F. monophora* in Cuba. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5–6, p. 439–444, jun. 2013.

BAE, S. K.; PARK, S.-J.; SHIM, E.-J.; MUN, J.-H.; KIM, E.-Y.; SHIN, J.-G.; SHON, J.-H. Increased Oral Bioavailability of Itraconazole and Its Active Metabolite, 7-Hydroxyitraconazole, When Coadministered with a Vitamin C Beverage in Healthy Participants. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 51, n. 3, p. 444–451, mar. 2011.

BAGLA, P.; LOEFFELHOLZ, M.; BLANTON, L. S. Cerebral Phaeohyphomycosis by *Fonsecaea monophora*: Report in a Patient with AIDS and a Ring Enhancing Lesion. **Medical Mycology Case Reports**, v. 12, p. 4–7, jun. 2016.

BARCHIESI, F.; DI FRANCESCO, L. F.; SCALISE, G. In vitro activities of terbinafine in combination with fluconazole and itraconazole against isolates of *Candida albicans* with reduced susceptibility to azoles. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 8, p. 1812–1814, 1997.

BEDOUT, C. de; GÓMEZ, B. L.; RESTREPO, A. In Vitro Susceptibility Testing of *Fonsecaea pedrosoi* to Antifungals. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, p. 145–148, maio 1997.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 2, 2004. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/academica/article/view/562>>. Acesso em: 27 jul. 2017.

BLYTH, C. C. Antifungal Azoles: Old and New. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, n. 6, p. 506–507, jun. 2011.

BOCCA, A. L.; BRITO, P. P. M. S.; FIGUEIREDO, F.; TOSTA, C. E. Inhibition of Nitric Oxide Production by Macrophages in Chromoblastomycosis: A Role for *Fonsecaea pedrosoi* Melanin. **Mycopathologia**, v. 161, n. 4, p. 195–203, abr. 2006.

BONIFAZ, A.; CARRASCO-GERARD, E.; SAUL, A. Chromoblastomycosis: Clinical and Mycologic Experience of 51 Cases. **Mycoses**, v. 44, n. 1–2, p. 1–7, mar. 2001.

BONIFAZ, A.; MARTÍNEZ-SOTO, E.; CARRASCO-GERARD, E.; PENICHE, J. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery, and a combination of both. **International journal of dermatology**, v. 36, p. 542–547, 1997.

BONIFAZ, A.; PAREDES-SOLÍS, V.; SAÚL, A. Treating Chromoblastomycosis with Systemic Antifungals. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 5, n. 2, p. 247–254, fev. 2004.

BOPP, C. [Therapy of chromoblastomycosis with a new method]. **Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana**, v. 4, n. 4, p. 285–292, 1976.

BRUMPT, E. **Precis de parasitologie**. 3rd. ed. Paris, France: Masson et Cie, 1922.

BRUNTON, L. L.; BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman (12a. ed.)**. São Paulo: Grupo A - AMGH, 2012.

BUTLER, M. J.; GARDINER, R. B.; DAY, A. W. Fungal Melanin Detection by the Use of Copper Sulfide-Silver. **Mycologia**, v. 97, n. 2, p. 312–319, abr. 2005.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal Agents: Mode of Action in Yeast Cells. **Revista Espanola De Quimioterapia: Publicacion Oficial De La Sociedad Espanola De Quimioterapia**, v. 19, n. 2, p. 130–139, jun. 2006.

CASTRO, R. M.; CASTRO, L. G. M. On the Priority of Description of Chromomycosis./Zur Priorität Der Beschreibung Der Chromomykose. **Mycoses**, v. 30, n. 9, p. 397–403, 24 abr. 2009.

CHANDRAN, V.; SADANANDAN, S. M.; SOBHANAKUMARI, K. Chromoblastomycosis in Kerala, India. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 78, n. 6, p. 728–733, dez. 2012.

CLEINMAN, I. B.; GONÇALVES, S. S.; NUCCI, M.; QUINTELLA, D. C.; HALPERN, M.; AKITI, T.; BARREIROS, G.; COLOMBO, A. L.; SANTORO-LOPES, G. Respiratory Tract Infection Caused by *Fonsecaea monophora* After Kidney Transplantation. **Mycopathologia**, 28 jun. 2017.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**. Approved standard-second edition ed. Wayne, PA. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute., 2008. v. 28

CRIADO, P. R.; CARETA, M. F.; VALENTE, N. Y. S.; MARTINS, J. E. C.; RIVITTI, E. A.; SPINA, R.; BELDA, W. Extensive Long-Standing Chromomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*: Three Cases with Relevant Improvement under Voriconazole Therapy. **The Journal of Dermatological Treatment**, v. 22, n. 3, p. 167–174, jun. 2011.

CUNHA, M. M. L. da. **Melanina como fator de virulência em *Fonsecaea pedrosoi*: atividade antioxidante, sequestro de óxido nítrico, resistência a antifúngicos e a estresses ambientais**. 2008. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Rio de Janeiro, 2008.

CUNHA, M. M.; FRANZEN, A. J.; SEABRA, S. H.; HERBST, M. H.; VUGMAN, N. V.; BORBA, L. P.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 80, 2010.

CUNHA, M. M. L.; FRANZEN, A. J.; ALVIANO, D. S.; ZANARDI, E.; ALVIANO, C. S.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Inhibition of Melanin Synthesis Pathway by Tricyclazole Increases Susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against Mouse Macrophages. **Microscopy Research and Technique**, v. 68, n. 6, p. 377–384, 15 dez. 2005.

DA SILVA, A. F. C.; RODRIGUES, M. L.; FARIAS, S. E.; ALMEIDA, I. C.; PINTO, M. R.; BARRETO-BERGTER, E. Glucosylceramides in *Colletotrichum Gloeosporioides* Are Involved in the Differentiation of Conidia into Mycelial Cells. **FEBS letters**, v. 561, n. 1–3, p. 137–143, 12 mar. 2004.

DABOIT, T. C.; MAGAGNIN, C. M.; HEIDRICH, D.; CASTRILLÓN, M. R.; MENDES, S. D. C.; VETTORATO, G.; VALENTE, P.; SCROFERNEKER, M. L. A Case of Relapsed Chromoblastomycosis Due to *Fonsecaea monophora*: Antifungal Susceptibility and Phylogenetic Analysis. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1–2, p. 139–144, ago. 2013.

DABOIT, T. C.; MASSOTTI MAGAGNIN, C.; HEIDRICH, D.; CZEKSTER ANTOCHEVIS, L.; VIGOLO, S.; COLLARES MEIRELLES, L.; ALVES, K.; SCROFERNEKER, M. L. *In Vitro* Susceptibility of Chromoblastomycosis Agents to Five

Antifungal Drugs and to the Combination of Terbinafine and Amphotericin B. **Mycoses**, v. 57, n. 2, p. 116–120, fev. 2014.

DANNAOUI, E.; AFELTRA, J.; MEIS, J. F.; VERWEIJ, P. E.; NETWORK, E.; OTHERS. *In vitro* susceptibilities of zygomycetes to combinations of antimicrobial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2708–2711, 2002.

DE AZEVEDO, C. M. P. S.; GOMES, R. R.; VICENTE, V. A.; SANTOS, D. W. C. L.; MARQUES, S. G.; DO NASCIMENTO, M. M. F.; ANDRADE, C. E. W.; SILVA, R. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; DE HOOG, G. S. *Fonsecaea pugnacius*, a Novel Agent of Disseminated Chromoblastomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2674–2685, ago. 2015.

DE HOOG, G.; ATTILI-ANGELIS, D.; VICENTE, V. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. **Medical Mycology**, v. 42, p. 405–416, out. 2004.

DE HOOG, G. S. Evolution of Black Yeasts: Possible Adaptation to the Human Host. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 63, n. 2, p. 105–109, fev. 1993.

DEL POETA, M.; SCHELL, W. A.; PERFECT, J. R. *In vitro* antifungal activity of pneumocandin L-743,872 against a variety of clinically important molds. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 8, p. 1835–1836, 1997.

DERESINSKI, S. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 36, n. 11, p. 1445–1457, 1 jun. 2003.

DUPONT, C.; DUONG, T. A.; MALLET, S.; MAMZER-BRUNEEL, M. F.; THERVET, E.; BOUGNOUX, M. E.; DUPONT, B. Unusual Presentation of Chromoblastomycosis due to *Cladophialophora carrionii* in a Renal and Pancreas Transplant Recipient Patient Successfully Treated with Posaconazole and Surgical Excision. **Transplant Infectious Disease**, v. 12, n. 2, p. 180–183, abr. 2010.

DÜRRBECK, A.; NENOFF, P. [Terbinafine: Relevant drug interactions and their management]. **Der Hautarzt; Zeitschrift Fur Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete**, v. 67, n. 9, p. 718–723, set. 2016.

EMA, E. M. A. **European Medicines Agency recommends suspension of marketing authorisations for oral ketoconazole**. London: European Medicines Agency, 2013. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Ketoconazole-containing_medicines/WC500146616.pdf>. Acesso em: 18 out. 2017.

EPAULARD, O.; LECCIA, M.-T.; BLANCHE, S.; CHOSIDOW, O.; MAMZER-BRUNEEL, M.-F.; RAVAUD, P.; THIEBAUT, A.; VILLIER, C.; LORTHOLARY, O. Phototoxicity and Photocarcinogenesis Associated with Voriconazole. **Medecine Et Maladies Infectieuses**, v. 41, n. 12, p. 639–645, dez. 2011.

ESTERRE, P.; INZAN, C. K.; RAMARCEL, E. R.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; RATSIOHARANA, M.; PECARRERE, J. L.; ROIG, P. Treatment of Chromomycosis with

Terbinafine: Preliminary Results of an Open Pilot Study. **The British Journal of Dermatology**, v. 134 Suppl 46, p. 33–36; discussion 40, jun. 1996.

ESTERRE, P.; QUEIROZ-TELLES, F. Management of Chromoblastomycosis: Novel Perspectives. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 19, n. 2, p. 148–152, abr. 2006.

FADER, R. C.; MCGINNIS, M. R. Infections Caused by Dematiaceous Fungi: Chromoblastomycosis and Phaeohyphomycosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 2, n. 4, p. 925–938, dez. 1988.

FDA, U. S. F. and D. A. **Drug Approval Package Cancidas (Caspofungin Acetate) Injection**, 2001. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2001/21227_Cancidas_Approv.pdf>.

FERRER, C.; COLOM, F.; FRASES, S.; MULET, E.; ABAD, J. L.; ALIO, J. L. Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2873–2879, 1 ago. 2001.

FRANZEN, A. J.; CUNHA, M. M. L.; BATISTA, E. J. O.; SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Effects of Tricyclazole (5-Methyl-1,2,4-triazol[3,4] Benzothiazole), a Specific DHN–melanin Inhibitor, on the Morphology of *Fonsecaea pedrosoi* Conidia and Sclerotic Cells. **Microscopy Research and Technique**, v. 69, n. 9, p. 729–737, set. 2006.

FRANZEN, A. J.; CUNHA, M. M. L.; MIRANDA, K.; HENTSCHEL, J.; PLATTNER, H.; DA SILVA, M. B.; SALGADO, C. G.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Ultrastructural Characterization of Melanosomes of the Human Pathogenic Fungus *Fonsecaea pedrosoi*. **Journal of Structural Biology**, v. 162, n. 1, p. 75–84, abr. 2008.

GAFFI. **Proposal for WHO STAG adoption as an NTD**, nov. 2016. Disponível em: <<https://www.gaffi.org/wp-content/uploads/Chromoblastomycosis-as-an-NTD-WHO-brief-final-2.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

GOMES, R. R.; VICENTE, V. A.; DE AZEVEDO, C. M.; SALGADO, C. G.; DA SILVA, M. B.; QUEIROZ-TELLES, F.; MARQUES, S. G.; SANTOS, D. W.; DE ANDRADE, T. S.; TAKAGI, E. H.; OTHERS. Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005102, 2016.

GÓMEZ, B. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and Fungi. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 91–96, abr. 2003.

GÓMEZ-LÓPEZ, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; MELLADO, E.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. In Vitro Evaluation of Combination of Terbinafine with Itraconazole or Amphotericin B against Zygomycota. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, n. 3, p. 199–202, mar. 2003.

GONZÁLEZ, G. M.; FOTHERGILL, A. W.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M. G.; LOEBENBERG, D. *In Vitro* Activities of New and Established Triazoles against Opportunistic Filamentous and Dimorphic Fungi. **Medical Mycology**, v. 43, n. 3, p. 281–284, jan. 2005.

GOSTINCAR, C.; GRUBE, M.; DE HOOG, S.; ZALAR, P.; GUNDE-CIMERMAN, N. Extremotolerance in Fungi: Evolution on the Edge. **FEMS microbiology ecology**, v. 71, n. 1, p. 2–11, jan. 2010.

GUERRA, C. R.; ISHIDA, K.; NUCCI, M.; ROZENTAL, S. Terbinafine inhibits *Cryptococcus neoformans* growth and modulates fungal morphology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 582–590, ago. 2012.

GUPTA, A. K.; TABORDA, P. R.; SANZOVO, A. D. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. **Medical Mycology**, v. 40, p. 529–534, 2002.

HAMZA, S. H.; MERCADO, P. J.; SKELTON, H. G.; SMITH, K. J. An Unusual Dematiaceous Fungal Infection of the Skin Caused by *Fonsecaea pedrosoi*: A Case Report and Review of the Literature. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 30, n. 5, p. 340–343, maio 2003.

HASELWANDTER, K.; EBNER, M. R. Microorganisms Surviving for 5300 Years. **FEMS microbiology letters**, v. 116, n. 2, p. 189–193, 15 fev. 1994.

HIRA, K.; YAMADA, H.; TAKAHASHI, Y.; OGAWA, H. Successful Treatment of Chromomycosis Using Carbon Dioxide Laser Associated with Topical Heat Applications. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 16, n. 3, p. 273–275, maio 2002.

HOF, H. Mycoses in the Elderly. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 5–13, jan. 2010.

IRINYI, L.; SERENA, C.; GARCIA-HERMOSO, D.; ARABATZIS, M.; DESNOS-OLLIVIER, M.; VU, D.; CARDINALI, G.; ARTHUR, I.; NORMAND, A.-C.; GIRALDO, A.; DA CUNHA, K. C.; SANDOVAL-DENIS, M.; HENDRICKX, M.; NISHIKAKU, A. S.; DE AZEVEDO MELO, A. S.; MERSEGUEL, K. B.; KHAN, A.; PARENTE ROCHA, J. A.; SAMPAIO, P.; DA SILVA BRIONES, M. R.; E FERREIRA, R. C.; DE MEDEIROS MUNIZ, M.; CASTANON-OLIVARES, L. R.; ESTRADA-BARCENAS, D.; CASSAGNE, C.; MARY, C.; DUAN, S. Y.; KONG, F.; SUN, A. Y.; ZENG, X.; ZHAO, Z.; GANTOIS, N.; BOTTEREL, F.; ROBBERTSE, B.; SCHOCH, C.; GAMS, W.; ELLIS, D.; HALLIDAY, C.; CHEN, S.; SORRELL, T. C.; PIARROUX, R.; COLOMBO, A. L.; PAIS, C.; DE HOOG, S.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; TAYLOR, M. L.; TORIELLO, C.; DE ALMEIDA SOARES, C. M.; DELHAES, L.; STUBBE, D.; DROMER, F.; RANQUE, S.; GUARRO, J.; CANO-LIRA, J. F.; ROBERT, V.; VELEGRAKI, A.; MEYER, W. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS Reference DNA Barcoding Database--the Quality Controlled Standard Tool for Routine Identification of Human and Animal Pathogenic Fungi. **Medical Mycology**, v. 53, n. 4, p. 313–337, 1 maio 2015.

JACOBSON, E. S. Pathogenic Roles for Fungal Melanins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 708–717, out. 2000.

JAMIL, A.; LEE, Y. Y.; THEVARAJAH, S. Invasive Squamous Cell Carcinoma Arising from Chromoblastomycosis. **Medical Mycology**, v. 50, n. 1, p. 99–102, jan. 2012.

KAJISHIMA, A. K. **Estudo da biogênese dos melanossomas e o controle da síntese da melanina pelo inibidor triclazol nos fungos demáceos *Fonsecaea pedrosoi* e *Wangiella dermatitidis***. Universidade Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2009. .

KIM, D. M.; HWANG, S. M.; SUH, M. K.; HA, G. Y.; CHOI, G. S.; SHIN, J.; HAN, S. H. Chromoblastomycosis Caused by *Fonsecaea pedrosoi*. **Annals of Dermatology**, v. 23, n. 3, p. 369, 2011.

KOO, S.; KLOMPAS, M.; MARTY, F. M. *Fonsecaea monophora* Cerebral Phaeohyphomycosis: Case Report of Successful Surgical Excision and Voriconazole Treatment and Review. **Medical Mycology**, v. 48, n. 5, p. 769–774, ago. 2010.

KUTTNER, B. J.; SIEGLE, R. J. Treatment of Chromomycosis with a CO₂ Laser. **The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology**, v. 12, n. 9, p. 965–968, set. 1986.

LA HOZ, R. M.; BADDLEY, J. W. Subcutaneous Fungal Infections. **Current Infectious Disease Reports**, v. 14, n. 5, p. 530–539, out. 2012.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. da C.; HEINS-VACCARI, E. M.; TAKAHASHI DE MELO, N. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LANE, C. G. A cutaneous disease caused by a new fungus *Phialophora verrucosa*. v. 33, p. 840–846, 1915.

LEMKE, T. L.; ZITO, S. W.; ROCHE, V. F.; WILLIAMS, D. A. **Essentials of Foye's principles of medicinal chemistry**. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2017.

LI, Y.; WAN, Z.; LI, R. In Vitro Activities of Nine Antifungal Drugs and Their Combinations against *Phialophora verrucosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5609–5612, set. 2014.

LIM, S.-W.; SUH, M.-K.; KANG, G.-S.; HA, G.-Y.; KIM, H.; CHOI, J.-S.; KIM, Y.-S. Molecular Phylogenetics of *Fonsecaea* Strains Isolated from Chromoblastomycosis Patients in South Korea. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. e415-420, set. 2011.

LIMONGI, C. L.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Protein Kinase Antagonists Inhibit Invasion of Mammalian Cells by *Fonsecaea pedrosoi*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. Pt 3, p. 201–209, mar. 2003.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. Chromomycosis: A Clinical and Mycologic Study of Thirty-Five Cases Observed in the Hinterland of Rio Grande Do Sul, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 25, n. 1, p. 132–135, jan. 1976.

LÓPEZ MARTÍNEZ, R.; MÉNDEZ TOVAR, L. J. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 188–194, mar. 2007.

LUPI, O.; TYRING, S. K.; MCGINNIS, M. R. Tropical Dermatology: Fungal Tropical Diseases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, n. 6, p. 931–951, dez. 2005.

LYON, J. P.; DE MARIA PEDROSO E SILVA AZEVEDO, C.; MOREIRA, L. M.; DE LIMA, C. J.; DE RESENDE, M. A. Photodynamic Antifungal Therapy Against Chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 172, n. 4, p. 293–297, out. 2011.

LYON, J. P.; MOREIRA, L. M.; DUTRA DE CARVALHO, V. S.; DOS SANTOS, F. V.; DE LIMA, C. J.; DE RESENDE, M. A. *In Vitro* Photodynamic Therapy against *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladophialophora carrionii*: PDT against *F. pedrosoi* and *C. carrionii*. **Mycoses**, v. 56, n. 2, p. 157–161, mar. 2013.

MARQUES, S. G.; SILVA, C. de M. P.; SALDANHA, P. C.; REZENDE, M. A.; VICENTE, V. A.; QUEIROZ-TELLES, F.; COSTA, J. M. L. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the Shell of the Babassu Coconut (*Orbignya phalerata martius*) in the Amazon Region of Maranhão Brazil. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi = Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 47, n. 4, p. 305–311, 2006.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J Bras Pneumol**, v. 32, n. 5, p. 449–60, 2006.

MCGINNIS, M. R. Chromoblastomycosis and Phaeohyphomycosis: New Concepts, Diagnosis, and Mycology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 8, n. 1, p. 1–16, jan. 1983.

MCGINNIS, M. R.; PASARELL, L. *In vitro* testing of susceptibilities of filamentous ascomycetes to voriconazole, itraconazole, and amphotericin B, with consideration of phylogenetic implications. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 8, p. 2353–2355, 1998.

MEDLAR, E. M. A cutaneous infection caused by a new fungus *Phialophora verrucosa* with a study of the fungus. v. 32, p. 507–522, 1915.

MELETIADIS, J.; POURNARAS, S.; ROILIDES, E.; WALSH, T. J. Defining Fractional Inhibitory Concentration Index Cutoffs for Additive Interactions Based on Self-Drug Additive Combinations, Monte Carlo Simulation Analysis, and In Vitro-In Vivo Correlation Data for Antifungal Drug Combinations against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 602–609, 1 fev. 2010.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SOARES, C. P.; DA SILVA, J. L. M.; ANDREOTTI, P. F. Interaction of Pathogenic Fungi with Host Cells: Molecular and Cellular Approaches. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 45, n. 3, p. 383–394, 1 set. 2005.

MENDOZA, L.; KARUPPAYIL, S. M.; SZANISZLO, P. J. Calcium Regulates *in Vitro* Dimorphism in Chromoblastomycotic Fungi. **Mycoses**, v. 36, n. 5–6, p. 157–164, jun. 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. DEPARTAMENTO DE ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. Formulário terapêutico nacional: RENAME**. 7. ed. Brasília, Brasil: Ministério da Saúde, 2010.

MINOTTO, R.; BERNARDI, C. D. V.; MALLMANN, L. F.; EDELWEISS, M. I. A.; SCROFERNEKER, M. L. Chromoblastomycosis: A Review of 100 Cases in the State of Rio

Grande Do Sul, Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 4, p. 585–592, abr. 2001.

MOORE, M.; ALMEIDA, F. Etiologic agents of chromomycosis (chromoblastomycosis of Terra, Torres, Fonseca and Leão, 1922) of North and South America. v. 6, p. 94–97, 1935.

MOUCHALOUAT, M. de F.; GUTIERREZ GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; MONTEIRO FIALHO, P. C.; DE OLIVEIRA COELHO, J. M. C.; TAVARES, S.; MORAIS, P.; FRANCESCONI DO VALLE, A. C. Chromoblastomycosis: a clinical and molecular study of 18 cases in Rio de Janeiro, Brazil. **International journal of dermatology**, v. 50, n. 8, p. 981–986, 2011.

NAJAFZADEH, M.; GUEIDAN, C.; BADALI, H.; VAN DEN ENDE, A. G.; XI, L.; HOOG, G. de. Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. **Medical mycology**, v. 47, n. 1, p. 17–25, 2009.

NAJAFZADEH, M. J.; BADALI, H.; ILLNAIT-ZARAGOZI, M. T.; DE HOOG, G. S.; MEIS, J. F. *In Vitro* Activities of Eight Antifungal Drugs against 55 Clinical Isolates of *Fonsecaea* Spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 1636–1638, 1 abr. 2010a.

NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE, V. A.; DE HOOG, G. S. Rapid Identification of Fungal Pathogens by Rolling Circle Amplification Using *Fonsecaea* as a Model: RCA in *Fonsecaea*. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. e577–e582, set. 2011a.

NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE, V. A.; KLAASSEN, C.; BONIFAZ, A.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.; MENKEN, S. B.; DE HOOG, G. S. Molecular epidemiology of *Fonsecaea* species. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 3, p. 464–469, 2011b.

NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE, V.; XI, L.; VAN DEN ENDE, A. H. G. G.; DE HOOG, G. S. *Fonsecaea nubica* Sp. Nov, a New Agent of Human Chromoblastomycosis Revealed Using Molecular Data. **Medical Mycology**, v. 48, n. 6, p. 800–806, set. 2010b.

NEGRONI, P. Estudio del primer caso argentino de cromomicosis *Fonsecaea* (Negroni) *pedrosoi* (Brumpt) 1921. v. 7, p. 419–426, 1936.

NIMRICHTER, L.; BARRETO-BERGTER, E.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; KNEIPP, L. F.; MAZZI, M. T.; SALVE, P.; FARIAS, S. E.; WAIT, R.; ALVIANO, C. S.; RODRIGUES, M. L. A Monoclonal Antibody to Glucosylceramide Inhibits the Growth of *Fonsecaea pedrosoi* and Enhances the Antifungal Action of Mouse Macrophages. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 7, p. 657–665, jun. 2004.

NOBRE, G.; OLIVEIRA, A. D. S.; VERDE, S. F.; MARTINS, O.; PICOTO, A. D. S. Chromomycosis: Report of a Case and Management by Cryosurgery, Topical Chemotherapy, and Conventional Surgery. **The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology**, v. 6, n. 7, p. 576–578, jul. 1980.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular microbiology**, v. 5, n. 4, p. 203–223, 2003.

OGAWA, M. M.; ALCHORNE, M. M. A.; BARBIERI, A.; CASTIGLIONI, M. L. V.; PENNA, A. P. B.; TOMIMORI-YAMASHITA, J. Lymphoscintigraphic Analysis in Chromoblastomycosis. **International Journal of Dermatology**, v. 42, n. 8, p. 622–625, ago. 2003.

PADHYE, A. A.; HAMPTON, A. A.; HAMPTON, M. T.; HUTTON, N. W.; PREVOST-SMITH, E.; DAVIS, M. S. Chromoblastomycosis Caused by *Exophiala spinifera*. **Clinical infectious diseases**, v. 22, n. 2, p. 331–335, 1996.

PALMEIRA, V. F.; KNEIPP, L. F.; ROZENTAL, S.; ALVIANO, C. S.; SANTOS, A. L. S. Beneficial Effects of HIV Peptidase Inhibitors on *Fonsecaea pedrosoi*: Promising Compounds to Arrest Key Fungal Biological Processes and Virulence. **PloS One**, v. 3, n. 10, p. e3382, 2008.

PASQUALOTTO, A. C.; THIELE, K. O.; GOLDANI, L. Z. Novel Triazole Antifungal Drugs: Focus on Isavuconazole, Ravuconazole and Albaconazole. **Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)**, v. 11, n. 2, p. 165–174, fev. 2010.

PATIL, A.; MAJUMDAR, S. Echinocandins in Antifungal Pharmacotherapy. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 26 jul. 2017.

PEDROSO, A.; GOMES, J. M. Sobre quatro casos de dermatite verrucosa produzida pela *Phialophora verrucosa*. v. 11, p. 53–61, 1920.

PEYTON, L. R.; GALLAGHER, S.; HASHEMZADEH, M. Triazole Antifungals: A Review. **Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)**, v. 51, n. 12, p. 705–718, dez. 2015.

PIRES, C. A. A.; XAVIER, M. B.; QUARESMA, J. A. S.; MACEDO, G. M. M. de; SOUSA, B. R. de M.; BRITO, A. C. de. Clinical, Epidemiological and Mycological Report on 65 Patients from the Eastern Amazon Region with Chromoblastomycosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, p. 555–560, ago. 2012.

POIRRIEZ, J.; BREUILLARD, F.; FRANCOIS, N.; FRUIT, J.; SENDID, B.; GROSS, S.; DEI-CAS, E. A case of chromomycosis treated by a combination of cryotherapy, shaving, oral 5-fluorocytosine, and oral amphotericin B. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 63, n. 1, p. 61–63, 2000.

QUEIROZ-TELLES, F. CHROMOBLASTOMYCOSIS: A NEGLECTED TROPICAL DISEASE. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 46–50, set. 2015.

QUEIROZ-TELLES, F.; DE C L SANTOS, D. W. Challenges in the Therapy of Chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5–6, p. 477–488, jun. 2013.

QUEIROZ-TELLES, F.; DE HOOG, S.; SANTOS, D. W. C. L.; SALGADO, C. G.; VICENTE, V. A.; BONIFAZ, A.; ROILIDES, E.; XI, L.; AZEVEDO, C. de M. P. e S.; DA SILVA, M. B.; PANA, Z. D.; COLOMBO, A. L.; WALSH, T. J. Chromoblastomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 233–276, jan. 2017.

QUEIROZ-TELLES, F.; ESTERRE, P.; PEREZ-BLANCO, M.; VITALE, R. G.; SALGADO, C. G.; BONIFAZ, A. Chromoblastomycosis: An Overview of Clinical Manifestations, Diagnosis and Treatment. **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. 3–15, jan. 2009.

QUEIROZ-TELLES, F.; MCGINNIS, M. R.; SALKIN, I.; GRAYBILL, J. R. Subcutaneous mycoses. **Subcutaneous mycoses**, v. 17, n. 1, p. 59–85, mar. 2003.

QUEIROZ-TELLES, F.; NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; TOBÓN, A.; RESTREPO, A. Mycoses of Implantation in Latin America: An Overview of Epidemiology, Clinical Manifestations, Diagnosis and Treatment. **Medical Mycology**, v. 49, n. 3, p. 225–236, abr. 2011.

QUEIROZ-TELLES, F.; PURIM, K. S.; FILLUS, J. N.; BORDIGNON, G. F.; LAMEIRA, R. P.; VAN CUTSEM, J.; CAUWENBERGH, G. Itraconazole in the Treatment of Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. **International Journal of Dermatology**, v. 31, n. 11, p. 805–812, nov. 1992.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D. W. C. L. Chromoblastomycosis in the Clinical Practice. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 4, p. 312–319, dez. 2012.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D. W. de C. L. Challenges in the Therapy of Chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5–6, p. 477–488, jun. 2013.

RASAMOELINA, T.; RAHAROLAHY, O.; RAKOTOZANDRINDRAINNY, N.; RANAIVO, I.; ANDRIANARISON, M.; RAKOTONIRINA, B.; MAUBON, D.; RAKOTOMALALA, F. A.; RAKOTO ANDRIANARIVELO, M.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; RAPELANORO RABENJA, F.; RAMAROZATOVO, L. S.; CORNET, M. Chromoblastomycosis and Sporotrichosis, Two Endemic but Neglected Fungal Infections in Madagascar. **Journal De Mycologie Medicale**, v. 27, n. 3, p. 312–324, set. 2017.

RESTREPO, A. Treatment of Tropical Mycoses. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 3 Pt 2, p. S91-102, set. 1994.

REVANKAR, S. G.; SUTTON, D. A. Melanized Fungi in Human Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 884–928, 1 out. 2010.

RIPPON, J. W. **Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. 3rd. ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1988.

ROJAS, O. C.; GONZÁLEZ, G. M.; MORENO-TREVIÑO, M.; SALAS-ALANIS, J. Chromoblastomycosis by *Cladophialophora carrionii* Associated with Squamous Cell Carcinoma and Review of Published Reports. **Mycopathologia**, v. 179, n. 1–2, p. 153–157, fev. 2015.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and Functions of Melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3696–3703, jun. 2000.

ROZENTAL, S.; ALVIANO, C. S.; DE SOUZA, W. The *in vitro* susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. **Mycopathologia**, v. 126, n. 2, p. 85–91, 1994.

ROZENTAL, S.; ALVIANO, C. S.; DE SOUZA, W. Fine structure and cytochemical study of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and rat polymorphonuclear leukocyte. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 34, p. 323–330, 1996.

RUDOLPH, M. Über die brasilianische “Figueira” (Vorläufige Mitteilung). v. 18, p. 498–499, 1914.

SALGADO, C. G.; SILVA, J. P. da; DINIZ, J. A. P.; SILVA, M. B. da; COSTA, P. F. da; TEIXEIRA, C.; SALGADO, U. I. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from Thorns of *Mimosa pudica*, a Probable Natural Source of Chromoblastomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, p. 33–36, fev. 2004.

SANTOS, A. L. S.; PALMEIRA, V. F.; ROZENTAL, S.; KNEIPP, L. F.; NIMRICHTER, L.; ALVIANO, D. S.; RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S. Biology and Pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the Major Etiologic Agent of Chromoblastomycosis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 5, p. 570–591, set. 2007.

SANTOS, D. W.; CAMARGO, L. F.; GONÇALVES, S. S.; OGAWA, M. M.; TOMIMORI, J.; ENOKIHARA, M. M.; MEDINA-PESTANA, J. O.; COLOMBO, A. L. Melanized Fungal Infections in Kidney Transplant Recipients: Contributions to Optimize Clinical Management. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 333.e9-333.e14, maio 2017.

SAWAYA, B. P.; BRIGGS, J. P.; SCHNERMANN, J. Amphotericin B Nephrotoxicity: The Adverse Consequences of Altered Membrane Properties. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 6, n. 2, p. 154–164, ago. 1995.

SCHMITT, J. V.; BOMBONATTO, G.; TRIERWEILER, S. M.; FABRI, A. B. General aspects of drug interactions with systemic antifungals in a retrospective study sample. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 3, p. 476–479, jun. 2013.

SEYEDMOUSAVI, S.; NETEA, M. G.; MOUTON, J. W.; MELCHERS, W. J. G.; VERWEIJ, P. E.; DE HOOG, G. S. Black Yeasts and Their Filamentous Relatives: Principles of Pathogenesis and Host Defense. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 527–542, jul. 2014.

SHI, D.; ZHANG, W.; LU, G.; DE HOOG, G. S.; LIANG, G.; MEI, H.; ZHENG, H.; SHEN, Y.; LIU, W. Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora* Misdiagnosed as Sporotrichosis and Cutaneous Tuberculosis in a Pulmonary Tuberculosis Patient. **Medical Mycology Case Reports**, v. 11, p. 57–60, mar. 2016.

SILVA, A. C. C. M.; SERRA NETO, A.; GALVÃO, C. E. S.; MARQUES, S. G.; SALDANHA, A. C. R.; SILVA, C. de M. P.; FISCHMAN, O.; SILVA, R. R. da; COSTA, M. do R. da S.; COSTA, J. M. L. Cromoblastomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no Estado do Maranhão. I-Aspectos clínicos, epidemiológicos e evolutivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. 1, p. 37–44, 1992.

SILVA, C. de M. P. e; SILVA, A. C. de M. e; MARQUES, S. C.; SALDANHA, A. C. R.; NASCIMENTO, J. D. L.; BRANCO, M. dos R. F. C.; SILVA, R. R.; COSTA, J. M. L. Associação de cromoblastomicose e hanseníase: relato de dois casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. 4, p. 241–244, dez. 1994.

SILVA, J. P.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: A Retrospective Study of 325 Cases on Amazonic Region (Brazil). **Mycopathologia**, v. 143, n. 3, p. 171–175, 1999 1998.

SILVA-ROCHA, W. P.; CARDOSO, F. J. R.; COLALTO, W.; MELO, A. S. A.; CHAVES, G. M. Clinical Improvement of Chromoblastomycosis Refractory to Itraconazole Successfully Treated with High Dose of Terbinafine. **The Journal of Dermatology**, v. 40, n. 9, p. 775–776, set. 2013.

SLESKAK, G.; INTHALAD, S.; STROBEL, M.; MARSCHAL, M.; HALL, M. J.; NEWTON, P. N. Chromoblastomycosis after a Leech Bite Complicated by Myiasis: A Case Report. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, dez. 2011. . Acesso em: 7 set. 2017.

SOLÓRZANO, S.; GARCÍA, R.; HERNÁNDEZ-CÓRDOVA, G. Cromomicosis: Reporte de Un Caso Incapacitante. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 28, n. 3, p. 552–555, set. 2011.

SUN, J.; NAJAFZADEH, M. J.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; VICENTE, V. A.; FENG, P.; XI, L.; DE HOOG, G. S. Molecular Characterization of Pathogenic Members of the Genus *Fonsecaea* Using Multilocus Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e41512, 2 ago. 2012.

SUN, J.; NAJAFZADEH, M. J.; VICENTE, V.; XI, L.; DE HOOG, G. S. Rapid Detection of Pathogenic Fungi Using Loop-Mediated Isothermal Amplification, Exemplified by *Fonsecaea* Agents of Chromoblastomycosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n. 1, p. 19–24, jan. 2010.

SUN, J.; ZHANG, J.; NAJAFZADEH, M. J.; BADALI, H.; LI, X.; XI, L.; DE HOOG, G. S. Melanization of a Meristematic Mutant of *Fonsecaea monophora* Increases Tolerance to Stress Factors While No Effects on Antifungal Susceptibility. **Mycopathologia**, v. 172, n. 5, p. 373–380, nov. 2011.

SURASH, S.; TYAGI, A.; DE HOOG, G. S.; ZENG, J. S.; BARTON, R. C.; HOBSON, R. P. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea monophora* . v. 43, n. 5, p. 465–72, ago. 2005.

SZANISZLO, P. J.; COOPER, B. H.; VOGES, H. S. Chemical Compositions of the Hyphal Walls of Three Chromomycosis Agents. **Sabouraudia**, v. 10, n. 1, p. 94–102, mar. 1972.

TAGAMI, H. Topical Heat Therapy for Cutaneous Chromomycosis. **Archives of Dermatology**, v. 115, n. 6, p. 740, 1 jun. 1979.

TAGAMI, H.; GINOZA, M.; IMAIZUMI, S.; URANO-SUEHISA, S. Successful Treatment of Chromoblastomycosis with Topical Heat Therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 10, n. 4, p. 615–619, jan. 1984.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 3, p. 512–526, maio 1993.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 1 dez. 2013.

TERRA, F.; TORRES, M.; FONSECA FILHO, O.; ARÊA LEÃO, A. E. Novo tipo de dermatite verrucosa; micose por *Acrotheca* com associação de leishmaniose. v. 36, p. 363–368, 1922.

TONIN, F. S.; STEIMBACH, L. M.; BORBA, H. H.; SANCHES, A. C.; WIENS, A.; PONTAROLO, R.; FERNANDEZ-LLIMOS, F. Efficacy and Safety of Amphotericin B Formulations: A Network Meta-Analysis and a Multicriteria Decision Analysis. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 17 ago. 2017.

TORRES-GUERRERO, E.; ISA-ISA, R.; ISA, M.; ARENAS, R. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 4, p. 403–408, jul. 2012.

TSIANAKAS, A.; PAPPAL, D.; BASOGLU, Y.; METZE, D.; TIETZ, H.; LUGER, T.; BONSMANN, G. Chromomycosis - Successful CO₂ Laser Vaporization. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 22, n. 11, p. 1385–1386, nov. 2008.

URIBE, F.; ZULUAGA, A. I.; LEON, W.; RESTREPO, A. Histopathology of Chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 105, n. 1, p. 1–6, jan. 1989.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394–3400, nov. 2002.

VICENTE, V. A.; NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; GOMES, R. R.; ROBL, D.; MARQUES, S. G.; AZEVEDO, C. M. P. S.; DE HOOG, G. S. Environmental Siblings of Black Agents of Human Chromoblastomycosis. **Fungal Diversity**, v. 65, n. 1, p. 47–63, mar. 2014.

WHO. **Report of the Tenth Meeting of the WHO Strategic and Technical Advisory Group for Neglected Tropical Diseases**. World Health Organization, Geneva, mar. 2017. . Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/NTD_STAG_report_2017.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2017.

WILLIAMS, K.; MANSH, M.; CHIN-HONG, P.; SINGER, J.; ARRON, S. T. Voriconazole-Associated Cutaneous Malignancy: A Literature Review on Photocarcinogenesis in Organ Transplant Recipients. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 58, n. 7, p. 997–1002, abr. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. **International Classification of Diseases (ICD-10)**, 2016. . Disponível em: <<http://www.who.int/classifications/icd/en/>>. Acesso em: 20 set. 2017.

XI, L.; SUN, J.; LU, C.; LIU, H.; XIE, Z.; FUKUSHIMA, K.; TAKIZAWA, K.; NAJAFZADEH, M. J.; HOOG, G. de. Molecular diversity of *Fonsecaea* (Chaetothyriales) causing chromoblastomycosis in southern China. **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. 27–33, 2009.

YAMAUTI, S. M.; BONFIM, J. R. de A.; BARBERATO-FILHO, S.; LOPES, L. C. [The essentiality and rationality of the Brazilian national listing of essential medicines]. **Ciencia & Saude Coletiva**, v. 22, n. 3, p. 975–986, mar. 2017.

YANG, Y.; HU, Y.; ZHANG, J.; LI, X.; LU, C.; LIANG, Y.; XI, L. A Refractory Case of Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora* with Improvement by Photodynamic Therapy. **Medical Mycology**, v. 50, n. 6, p. 649–653, ago. 2012.

YU, J.; LI, R.; ZHANG, M.; LIU, L.; WAN, Z. *In Vitro* Interaction of Terbinafine with Itraconazole and Amphotericin B against Fungi Causing Chromoblastomycosis in China. **Medical Mycology**, v. 46, n. 7, p. 745–747, jan. 2008.

ZAITS, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B.; FRAMIL, V. M. de S. **Compêndio de Micologia Médica**. 2. ed. [s.l.] Guanabara koogan, 2010.

ZHANG, J.; XI, L.; LU, C.; LI, X.; XIE, T.; ZHANG, H.; XIE, Z.; DE HOOG, S. Successful Treatment for Chromoblastomycosis Caused by *Fonsecaea monophora*: A Report of Three Cases in Guangdong, China. **Mycoses**, v. 52, n. 2, p. 176–181, mar. 2009a.

ZHANG, J.; XI, L.; ZHANG, H.; XIE, Z.; SUN, J.; LI, X.; LU, S. Synergistic effects of terbinafine and itraconazole on clinical isolates of *Fonsecaea monophora*. **European Journal of Dermatology**, v. 19, n. 5, p. 451–455, 2009b.

ANEXOS

Anexo A: Intervalo de concentração inibitória mínima e concentração efetiva mínima para os diferentes fármacos antifúngicos frente às cepas de referência de *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. krusei* (ATCC 6258) e *A. flavus* (ATCC 204304) utilizadas nesse estudo.

Number 16

M38-A1

Table 4. Recommended MIC or MEC Limits for QC and Reference Strains for Broth Dilution Procedure⁵. (Reprinted with permission from the authors and the American Society for Microbiology.)

Organism	Purpose	Antifungal Agent	MIC Range (µg/mL)	Mode	% of MICs Within Range	Incubation Times
<i>Penicillium variotii</i> ATCC [®] MYA-3630 ^{6,9} (see note 4)	QC	Amphotericin B	1-4	2.0	100.0	48 hours
		Itraconazole	0.06-0.5	0.12	100.0	48 hours
		Voriconazole	0.015-0.12	0.06	100.0	48 hours
		Posaconazole	0.03-0.25	0.06	99.5	48 hours
	Reference (MEC)	Anidulafungin	<=0.015	N/A	100.0	24 hours
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC [®] 22019 ^{21,29}	QC	Amphotericin B	0.5-4.0	2.0	91.7	48 hours
		5FC	0.12-0.5	0.25	97.9	48 hours
		Fluconazole	1.0-4.0	2.0	98.1	48 hours
		Itraconazole	0.12-0.5	0.25	97.5	48 hours
		Ketoconazole	0.06-0.5	0.12	98.3	48 hours
		Voriconazole	0.03-0.25	0.06	100.0	48 hours
		Ravuconazole	0.03-0.25	0.06	98.3	48 hours
		Posaconazole	0.06-0.25	0.12	98.8	48 hours
		Anidulafungin	0.5-2.0	1.0	95.0	48 hours
		Caspofungin	0.5-4.0	1.0	92.9	48 hours
		Micafungin	0.5-4.0	1.0	100.0	48 hours
<i>Candida krusei</i> ATCC [®] 6258 ^{21,29}	QC	Amphotericin B	1.0-4.0	2.0	100.0	48 hours
		5FC	8.0-32	16	99.6	48 hours
		Fluconazole	16-128	32	100.0	48 hours
		Itraconazole	0.25-1.0	0.5	100.0	48 hours
		Ketoconazole	0.25-1.0	0.5	99.6	48 hours
		Voriconazole	0.12-1.0	0.5	100.0	48 hours
		Ravuconazole	0.25-1.0	0.5	100.0	48 hours
		Posaconazole	0.12-1.0	0.5	99.6	48 hours
		Anidulafungin	0.03-0.12	0.06	97.5	48 hours
		Caspofungin	0.25-1.0	0.5	97.5	48 hours
		Micafungin	0.12-0.5	0.25	99.0	48 hours
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC [®] 204304 ^{3,4} (see note 3)	Reference	Amphotericin B	0.5-4	ND	100.0	48 hours
		Itraconazole	0.25-0.5	ND	100.0	48 hours
		Voriconazole	0.5-4	ND	100.0	48 hours
		Ravuconazole	0.5-4	ND	100.0	48 hours
		Posaconazole	0.06-0.5	ND	100.0	48 hours
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC [®] MYA-3626 ^{6,9} (see note 4)	Reference	Amphotericin B	0.5-4.0	2.0	98.7	48 hours
		Itraconazole	0.25-2.0	1.0	95.7	48 hours
		Voriconazole	0.25-1.0	0.5	100.0	48 hours
	Reference (MEC)	Anidulafungin	<=0.015	N/A	100.0	24 hours
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC [®] MYA-3627 ⁶	Reference	Amphotericin B	0.5-4.0	2.0	99.2	48 hours
		Itraconazole	≥ 16	≥16	95.0	48 hours
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC [®] MYA-3631 ⁶	Reference	Amphotericin B	1.0-8.0	2.0	98.8	48 hours
		Voriconazole	0.5-2.0	1.0	98.3	48 hours
		Posaconazole	0.12- 1.0	0.5	97.1	48 hours