

**HELENO RAMOS MASSOUD JUNIOR**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA *in vitro* DA AÇÃO DE ANTIFÚNGICOS  
EM CEPAS DE *Fonsecaea pedrosoi***

**BELÉM**

**2014**

**HELENO RAMOS MASSOUD JUNIOR**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA *in vitro* DA AÇÃO DE ANTIFÚNGICOS  
EM CEPAS DE *Fonsecaea pedrosoi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

**Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado**

**Instituto de Ciências Biológicas – UFPA**

**BELÉM**

**2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

---

Massoud Junior, Heleno Ramos, 1986-  
Análise morfológica in vitro da ação de  
antifúngicos em cepas de *Fonsecaea pedrosoi* /  
Heleno Ramos Massoud Junior. - 2014.

Orientador: Cláudio Guedes Salgado.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal  
do Pará, Instituto de Ciências Biológicas,  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e  
Biologia Celular, Belém, 2014.

1. Micose. 2. Antimicóticos. 3. Fungos  
patogênicos. 4. Morfologia. I. Título.

CDD 22. ed. 616.969

---

**HELENO RAMOS MASSOUD JUNIOR**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA *in vitro* DA AÇÃO DE ANTIFÚNGICOS  
EM CEPAS DE *Fonsecaea pedrosoi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

**Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado**

**Instituto de Ciências Biológicas – UFPA**

**Banca Examinadora:**

**1. Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior  
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA**

**2. Prof. Dr. Moises Batista da Silva  
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA**

**BELÉM**

**2014**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente à minha esposa Kamila, por todo apoio, incentivo, compreensão, amor e companheirismo durante os últimos quatro anos. Sem dúvida, minha grande força de motivação.

Aos meus pais, Heleno e Arlete, pelo dom da vida, os ensinamentos, as lições e todo o incentivo e amor durante estes anos. Estendo este agradecimento às minhas irmãs Arlene e Mariana, aos meus sobrinhos Daniel e Sophia e ao meu cunhado Alexandre.

Ao Professor Claudio Salgado pela orientação nesse trabalho e pela oportunidade de realização desta pós-graduação. Ao Professor Moises Silva, pelos ensinamentos e oportunidades durante os últimos anos.

Ao Professor José Antônio Diniz Junior, por proporcionar as análises de microscopia eletrônica, no Instituto Evandro Chagas (IEC).

A Professora Maria Lúcia Scroferneker da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) por gentilmente nos fornecer alguns dos fármacos utilizados neste estudo. Agradeço também a Uci-Farma, pela doação da 5-Fluorocitosina.

Aos amigos do Laboratório de Dermato-Imunologia Daniella, Tânia, Josafá, Angélica, Amanda, Simone, Suellen, Naila, Raimundo, Eusébio, Giselle e André pelo apoio em diferentes momentos durante a realização deste trabalho. Agradeço também ao Centro de Referência em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Cândia e aos pacientes que gentilmente participaram deste estudo.

As instituições Universidade Federal do Pará (UFPA), Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa (FAPESPA) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio institucional e financeiro, respectivamente.

## RESUMO

A cromoblatomicose (CBM) é uma doença causada por implantação transcutânea de várias espécies de fungos melanizados. O estado do Pará é a principal área endêmica do país, sendo *Fonsecaea pedrosoi* o principal agente etiológico. O tratamento desta doença não é padronizado e diversas formas de intervenção são relatadas na literatura. Por outro lado, os testes de susceptibilidade *in vitro* aos fármacos antifúngicos podem ajudar na escolha do esquema terapêutico e na identificação de cepas resistentes. Este trabalho tem como objetivo avaliar a susceptibilidade *in vitro* ao itraconazol (ITZ), ao cetoconazol, (CTZ), ao fluconazol (FCZ) e a terbinafina (TBF) em 20 isolados clínicos de *Fonsecaea pedrosoi*, bem como as possíveis alterações morfológicas induzidas por ITZ ou TBF na Concentração Inibitória Mínima (CIM) e em altas concentrações. Os testes de susceptibilidade foram conduzidos de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, documento M38-A2). As concentrações finais de ITZ, TBF e CTZ em cada teste variaram de 16 a 0.03 µg/mL e de 64 a 0.125 µg/mL para o FCZ. A CIM para cada fármaco utilizado foi obtida após cinco dias de incubação a 30°C, sendo definida como a mínima concentração do fármaco capaz de reduzir em 100% o crescimento visual do fungo quando comparado com o grupo controle. O ITZ demonstrou ser o fármaco mais efetivo *in vitro* contra conídios de *F. pedrosoi* (CIM<sub>90</sub> = 1 µg/mL). A TBF apresentou baixa atividade *in vitro*, com 70% das cepas apresentando CIM ≥ 0.5 µg/mL. Quando se analisa morfológicamente os conídios tratados com a CIM para ITZ observa-se um aumento no diâmetro celular, a presença de conídios em processo de divisão e formação de pequenas cadeias. Na maior concentração do teste de susceptibilidade (16 µg/mL) observou-se a irregularidade no contorno celular, o desprendimento de material pigmentado da parede celular e a vacuolização. Em 32 µg/mL e 64 µg/mL notou-se a ruptura da parede celular e conídios amorfos. Não foram observadas - em nenhuma das concentrações analisadas - alterações morfológicas significativas induzidas pela TBF. Além disso, a 5-Fluorocitosina (5-FC) e o FCZ não impediram o crescimento dos conídios, mesmo em altas concentrações. No entanto, alterações ultraestruturais foram notadas após tratamento com 5-FC 64 µg/mL. Portanto, sugere-se um comportamento morfológico diferente de conídios frente ao ITZ ou TBF durante os testes de susceptibilidade *in vitro*. Em síntese, dentre os fármacos estudados, ITZ apresentou a melhor atividade antifúngica *in vitro*, enquanto a 5-FC somente provocou alterações estruturais em hifas e conídios na mais alta concentração utilizada no estudo.

Palavras-Chave: Cromoblastomicose. *Fonsecaea pedrosoi*. Antifúngicos. Morfologia.

## ABSTRACT

Chromoblastomycosis (CBM) is a disease caused by traumatic implantation of many species of melanized fungi. The State of Pará is the major endemic area in Brazil and *Fonsecaea pedrosoi* is the major etiological agent. The treatment is not standardized and many forms of interventions are related in the literature. In the other hand, the *in vitro* susceptibility test to antifungal drugs may help in the therapeutic choice and in the identification of resistant strains. The objective of this work is to evaluate the *in vitro* susceptibility of 20 *F. pedrosoi* clinical isolates to itraconazole (ITZ), ketoconazole (KCZ), fluconazole (FCZ) and terbinafine (TBF) as well as the possible morphological alterations induced by ITZ or TBF in the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and high concentrations. The tests were performed according to the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, M38-A2 document) recommendations. The final concentrations of ITZ, TBF and KCZ in each test were to 16 to 0.03 µg/mL. To FCZ the final concentrations were to 64 to 0.125 µg/mL. The MIC was defined as the lowest drug concentration that inhibit 100% the visual growth when compared to the non-treated group after five days of incubation at 30°C. ITZ proved to be the most effective drug *in vitro* against *F. pedrosoi* (CIM<sub>90</sub> = 1 µg/mL). TBF showed a low drug activity with 70% of the isolates with MIC ≥ 0.5 µg/mL. The conidia morphological analysis revealed an increasing in the diameter, an interruption of the cellular division and the formation of little chains after the treatment with ITZ in the MIC. At the high concentration used in the susceptibility test we noticed an irregular shape, a detachment of pigmented material from the cell wall and a vacuolization. Rupture in cell wall and amorphous conidia were observed at 32 µg/mL and 64 µg/mL. Significant alterations were not observed after treatment with TBF at the same concentrations. Moreover, the 5-fluorocytosine (5-FC) and FCZ do not stop the conidia growth at high concentrations. However, ultrastructure alterations were noticed after treatment with 5-FC 64 µg/mL. Thus, it is suggested a different morphological pattern after ITZ or TBF treatment during the *in vitro* susceptibility test. In synthesis, ITZ shown better *in vitro* antifungal activity while 5-FC only provoked structures alterations in the highest concentration tested.

Key-words: Chromoblastomycosis. *Fonsecaea pedrosoi*. Antifungal drugs. Morphology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição mundial dos casos de cromoblastomicose.....	11
<b>Figura 2:</b> Distribuição nacional dos casos publicados de cromoblastomicose.....	12
<b>Figura 3:</b> Agentes etiológicos da cromoblastomicose.....	13
<b>Figura 4:</b> Diferentes formas clínicas da cromoblastomicose.....	14
<b>Figura 5:</b> Características de <i>F. pedrosoi</i> .....	18
<b>Figura 6:</b> Estrutura química de alguns fármacos antifúngicos.....	21
<b>Figura 7:</b> Determinação da CIM para o itraconazol.....	33
<b>Figura 8:</b> Teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> ao itraconazol e a terbinafina.....	34
<b>Figura 9:</b> Comparação entre os conídios na CIM com conídios não tratados.....	35
<b>Figura 10:</b> Alterações morfológicas induzidas por itraconazol 16 µg/mL em conídios.....	36
<b>Figura 11:</b> Conídios tratatados com altas concentrações de itraconazol e terbinafina.....	36
<b>Figura 12:</b> Crescimento de colônias após tratamento com itraconazol e terninafina em altas concentrações.....	37
<b>Figura 13:</b> Conídios tratados com 5-FC.....	38
<b>Figura 14:</b> Eletromicrografia de varredura após tratamento com 5-FC 64 µg/mL	38

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Características demográficas, forma clínica e agente etiológico isolado de 20 pacientes de cromoblastomicose..... 32
- Tabela 2:** Concentração Inibitória Mínima (CIM), CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub> e Média Geométrica para 20 cepas isoladas de pacientes com cromoblastomicose..... 34

## SUMÁRIO

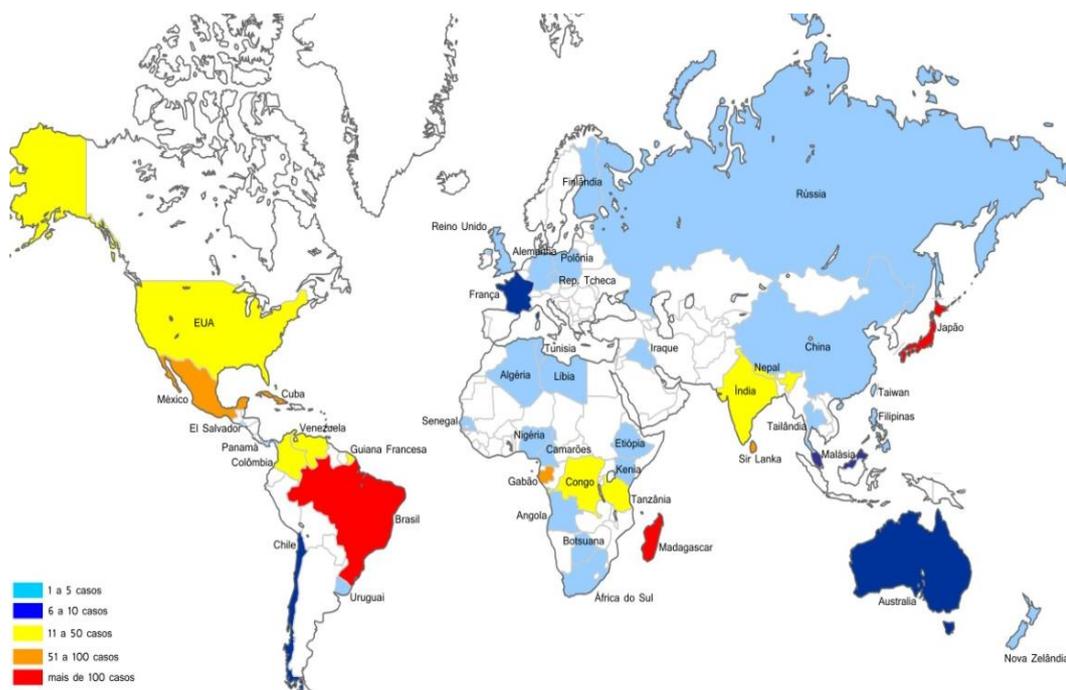
DESCRIÇÃO	PÁGINA
<b>CAPA</b> .....	i
<b>FOLHA DE ROSTO</b> .....	ii
<b>BANCA EXAMINADORA</b> .....	iii
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iv
<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>SUMÁRIO</b> .....	ix
1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1. CROMOBLASTOMICOSE .....	10
1.2. O FUNGO <i>F. pedrosoi</i> .....	16
1.3. FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS.....	19
1.4. TRATAMENTO DA CROMOBLASTOMICOSE.....	23
1.5. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE <i>in vitro</i> .....	25
2. <b>OBJETIVOS</b> .....	27
2.1. OBJETIVO GERAL.....	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
3.1. PACIENTES E ESQUEMAS TERAPÊUTICOS.....	28
3.2. COLETA DE MATERIAL E AMOSTRAS FÚNGICAS.....	28
3.3. PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	28
3.4. PREPARAÇÃO DOS AGENTES ANTIFÚNGICOS.....	29
3.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	29
3.6. ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	29
3.7. DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO DO CONÍDIO.....	30
3.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	30
3.9. ASPECTOS ÉTICOS.....	30
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4. <b>RESULTADOS</b> .....	32
5. <b>DISCUSSÃO</b> .....	39
6. <b>CONCLUSÕES</b> .....	44
7. <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	45

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CROMOBLASTOMICOSE

A cromoblastomicose é uma infecção fúngica crônica de tecido cutâneo e subcutâneo causada por implantação traumática de várias espécies de fungos dematiáceos, ou seja, fungos melanizados (AMEEN, 2009). Cabe ao médico alemão Max Rudolph, em 1914, a primeira descrição desta micose, relatando-a como “figueira”, na cidade de Estrela do Sul, situada entre os Estados de Minas Gerais e Goiás. No entanto, a observação do primeiro caso é atribuída ao pesquisador brasileiro Alexandrino Pedroso, em 1911, no Estado de São Paulo (LEÃO, 2013). Em 1922, Terra e colaboradores definiram-na como uma dermatite verrucosa causada por fungos pigmentados e introduziram o termo “cromoblastomicose” (LOPEZ & MENDEZ TOVAR, 2007). 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 e pé-musgoso (LACAZ et al., 2002b; LUPI *et al.*, 2005) . Atualmente, a doença é mais conhecida como cromomicose ou cromoblastomicose, sendo este último o nome oficial (LOPEZ & MENDEZ TOVAR, 2007).

Esta micose apresenta distribuição global, com predominância em regiões tropicais e subtropicais. O maior número de casos está concentrado no Continente Africano e nas Américas, em países como África do Sul, Brasil, Costa Rica e Madagascar (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011), o principal foco da doença no mundo (ESTERRE *et al.*, 1996a; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2012). No continente americano, a infecção também ocorre nos Estados Unidos, México, Venezuela, República Dominicana, Cuba, Colômbia, e, com um pequeno número de casos, em Porto Rico, Peru, Equador e Argentina. Na Ásia, casos da doença são reportados frequentemente no Japão, China e Malásia. Na Europa, a maioria dos casos se concentra na Rússia, República Checa, Romênia e Alemanha. Na África, os principais focos são Madagascar, Camarões, Ruanda, Zâmbia e Nigéria. Na Oceania, um pequeno número de casos é registrado na Austrália (LOPEZ & MENDEZ TOVAR, 2007) (figura 1).

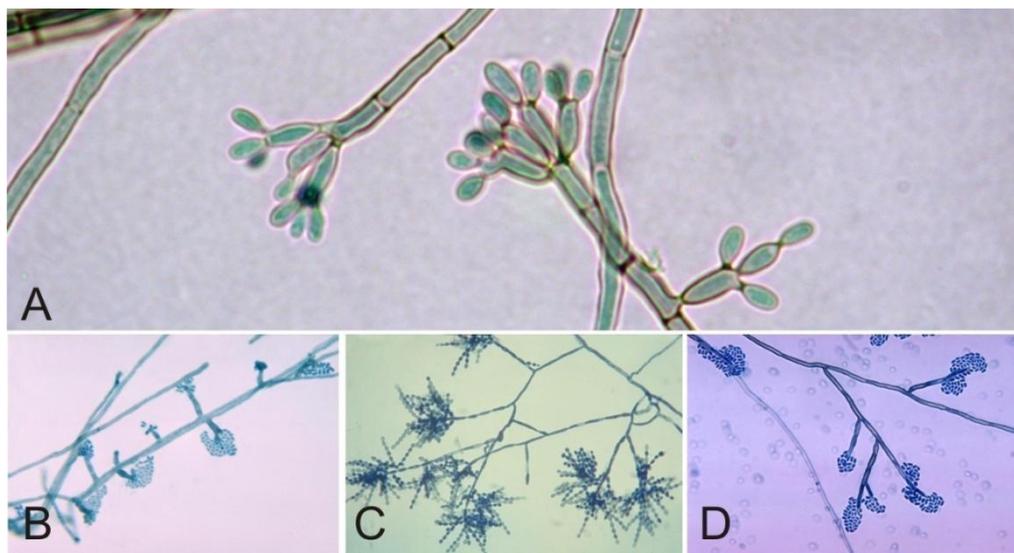


**Figura 1. Distribuição mundial dos casos de cromoblastomicose.** Azul claro (países com menos de 10 casos registrados), Amarelo (até 50 casos), laranja (entre 50 e 100 casos) e vermelho (acima de 100 casos). Fonte: Arquivo do Laboratório de Dermatologia-Imunologia.

No Brasil, a cromoblastomicose não é considerada doença de notificação compulsória, registrando-se um número aproximado de 520 casos na literatura (MOUCHALOUAT *et al.*, 2011). Os Estados com as maiores médias anuais de casos são: Rio Grande do Sul, Paraná, Maranhão e Pará (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011) (figura 2). No Pará, 325 casos foram registrados entre os anos de 1942 e 1997 (SILVA *et al.*, 1998). Somente entre os anos de 2001 e 2008 foram cadastrados na Unidade de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Candia (URE-Marcello Candia) mais de 110 casos novos de cromoblastomicose, o que caracteriza o Estado do Pará como a principal área endêmica do país (PEREIRA, 2008) e como a segunda área de maior prevalência da doença no mundo, atrás apenas de Madagascar (SALGADO *et al.*, 2005).

Os agentes etiológicos da cromoblastomicose pertencem principalmente aos gêneros *Cladophialophora*, *Phialophora*, e *Fonsecaea* (AMEEN, 2010); *Fonsecaea pedrosoi* (figura 3A) e *Cladophialophora carrionii* (figura 3C) 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 húmidas e *C. carrionii* em regiões semiáridas (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009). Outras espécies têm sido associadas com menor frequência a esta



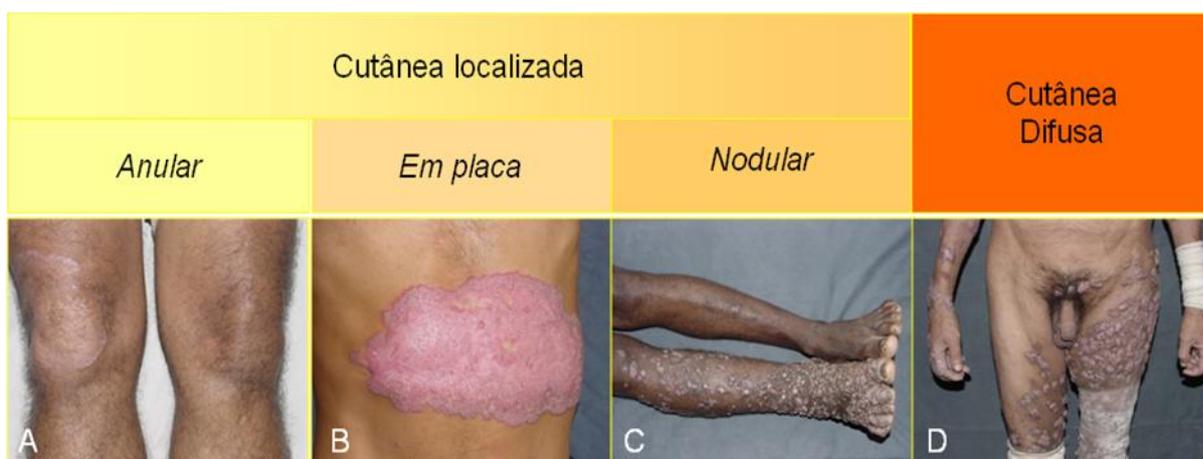


**Figura 3. Agentes etiológicos da cromoblastomicose, A) *Fonsecaapedrosoi*, B) *Phialophora verrucosa*, C) *Cladophialophoracarrioni* e D) *Exophialaspiniifera* .Fontes: A) Arquivo do Laboratório de Dermato-Imunologia; B) ,C) e D) <http://www.medicalhealthcareinfo.com>.**

A infecção tem início após a implantação transcutânea de elementos fúngicos presentes nestes materiais (RUBIN *et al.*, 1991), principalmente nos membros inferiores e superiores de trabalhadores rurais do sexo masculino (BONIFAZ *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 1998). No local da implantação se forma uma lesão unilateral, com a presença de pequenas pápulas eritematosas de superfície lisa. As pápulas aumentam de tamanho em poucas semanas, algumas vezes apresentando superfície escamosa. Com o passar do tempo, a lesão inicial evolui para diferentes tipos de lesões, caracterizando o aspecto clínico polimórfico da doença (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009). O curso crônico inicia-se com lesões verrucosas associadas a nódulos; estes podem ulcerar e tornar-se vegetantes, com aspecto papilomatoso semelhante à couve-flor. Em alguns casos pode ocorrer quadro de disseminação (SALGADO *et al.*, 2005). As complicações do quadro crônico inflamatório incluem a fibrose, o linfodema e a infecção bacteriana secundária (BONIFAZ *et al.*, 2010)

Em 1950, Carrión introduziu uma classificação clínica para as lesões de cromoblastomicose definida em cinco diferentes formas: nodular, tumoral, verrucosa, placa e cicatricial (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009). Posteriormente, alguns pesquisadores passaram a classificar as lesões de acordo com o grau de severidade: formas leves, moderadas e severas, baseadas na extensão da área atingida, no número de lesões, na presença de complicações e na resposta ao tratamento (CASTRO *et al.*, 2003).

Salgado *et al.* (2005) descreveram uma nova forma clínica, cromoblastomicose cutânea difusa, caracterizada por lesões nodulares e verrucosas com extensa distribuição na pele. Quatro anos depois, este mesmo grupo publicou casos de lesões localizadas, papuloescamosas, com formato anular e excelente resposta ao antifúngico itraconazol. Essa nova forma clínica, contrastante com o quadro anterior, foi denominada de cromoblastomicose cutânea localizada anular (SALGADO *et al.*, 2009). Essas observações levaram a uma nova proposta de classificação, fundamentada em mais de 140 casos diagnosticados na Unidade de Referência em Dermatologia Sanitária do Estado do Pará “Dr. Marcelo Cândia” (URE/MC). Duas formas principais são definidas: 1) cutânea localizada, a qual pode ser anular, em placa ou nodular e 2) cutânea difusa, sempre nodular (figura 4)



**Figura 4. Diferentes formas clínicas da cromoblastomicose.** Cutânea localizada anular (A), em placa (B) ou nodular (C); cutânea difusa (D), sempre nodular. Todas as lesões são verrucosas. Fontes: A) Salgado *et al.* (2008); B), C) e D) Arquivo do Laboratório de Dermato-Imunologia.

A cromoblastomicose é considerada uma doença ocupacional, ligada as atividades rurais e florestais, que acomete especialmente trabalhadores de baixa renda desprovidos de calçados e vestimentas adequados para a realização destas atividades (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011). Raramente ocorre antes da idade adulta e predomina em homens de 30 a 50 anos, com proporção de 5:1 a 9:1 em relação ao sexo feminino (LOPEZ & MENDEZ TOVAR, 2007). A faixa etária mais atingida coincide com a fase mais produtiva do indivíduo, tornando os pacientes morbidamente limitados tanto para o trabalho quanto para o convívio social (LACAZ *et al.*, 2002b).

No tecido do hospedeiro, os agentes da cromoblastomicose apresentam-se sob a forma de elementos esféricos ou ovóides denominados células escleróticas ou corpos muriformes (figura 5b). Encontram-se isolados ou agrupados, com parede espessa e coloração marrom ou fuliginosa característica (LACAZ et al., 2002b). Esta estrutura representa uma forma vegetativa intermediária entre a célula leveduriforme e a hifa (MCGINNIS, 1983) reproduzindo-se por septação em vários planos (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2003). Tratam-se, portanto, de fungos dimórficos, os quais apresentam uma forma filamentosa saprofítica e uma forma parasitária (DA SILVA *et al.*, 2002). A presença de estruturas semelhantes morfológicamente às células escleróticas já foi documentada em tecido medular das cactáceas *Ritterocerus griseus* e *R.deficiens* (ZEPPEFELDT *et al.*, 1994) Ademais, células escleróticas foram observadas nos espinhos da planta *M. pudica*, sendo similares as encontradas na lesão de um paciente após o contato com estes. Sendo assim, não é possível afirmar qual forma do fungo penetra na pele e produz a doença: hifa, conídio ou células escleróticas (SALGADO, 2010).

As células escleróticas são patognomônicas da cromoblastomicose. Dessa forma, o diagnóstico laboratorial consiste na observação dessas estruturas em microscopia óptica a partir do raspado das lesões, especialmente em regiões chamadas de “blackdots” (pontos enegrecidos nas lesões que representam a eliminação do fungo pela epiderme) (AMEEN, 2010;GARNICA *et al.*, 2009). Além do exame micológico direto, realizado com KOH 10 - 20%, estas células podem ser observadas em cortes histológicos corados obtidos por meio de biópsia. Nestes também se observam hiperkeratose, parakeratose, hiperplasia pseudoepiteliomatosa e uma resposta tecidual granulomatosa com infiltrado celular e abscesso (MCGINNIS, 1983;QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2003)

O crescimento dos agentes etiológicos em meio de cultura, a partir de raspado ou biópsia do tecido lesionado, também constitui ferramenta auxiliar no diagnóstico, inconclusivo para a identificação do agente etiológico. As culturas deverão ser realizadas em meios ágar-Sabouraud e Czapek, mantidos a temperatura ambiente. 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 (AMEEN, 2010).

Por meio do microcultivo em lâmina, pode se inferir as espécies de acordo com o tipo de conidiação predominante: o tipo *Cladosporium* apresenta conidióforos de comprimento variado, eretos e variadamente ramificados, próximo ao ápice. Os conídios geralmente apresentam duas escaras (disjuntores) escuras resultantes da união de um conídio com o outro; o tipo *Rhinocladiella* possui conidióforo nodoso com conidiação acropleurógena. Os conídios estão unidos por apículos ao conidióforo; o tipo *Phialophora* apresenta conidiação semi-endógena, em fiálides com colarete conspícuo, produzindo os fialoconídios (LACAZ et al., 2002b). A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido aplicada para a identificação do gênero *Fonsecaea* (ABLIZ et al., 2003) e de *Cladophialophora carrionii* (ABLIZ et al., 2004).

Recentemente, com o constante desenvolvimento da biotecnologia, novas ferramentas de distinção entre as espécies vêm sendo aplicadas, baseadas em sequências multilocus do espaçador interno transcrito (ITS) do DNA ribossomal, em sequências parciais de  $\beta$ -tubulina (*BT2*), actina (*ACT1*) e genes do ciclo de divisão celular (*CDC42*). Estas sequências podem ser obtidas por análises de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) (NAJAFZADEH et al., 2011b), por amplificação isotérmica do DNA (LAMP) (SUN et al., 2010) ou amplificação por círculo rolante (RCA) (NAJAFZADEH et al., 2011a).

## 1.2 O FUNGO *F. pedrosoi*

*F. pedrosoi* é o principal agente etiológico da cromoblastomicose no Estado do Pará (SILVA et al., 1998). Taxonomicamente pertencente à classe *Hyphomycetes*, ordem *Chaetothyriales*, família *Herpotrichiellaceae* e gênero *Fonsecaea*, apresentando hifas e conídios melanizados (DE HOOG et al., 2004). Apresenta o mesmo nicho natural de outras espécies dematiáceas, como o solo, madeiras e plantas em decomposição (SALGADO et al., 2004). A análise morfológica do cultivo de *F. pedrosoi* revela, macroscopicamente, colônias de aspecto aveludado, anverso com coloração verde oliva a negro e reverso negro (figura 5c). Microscopicamente, observam-se hifas septadas, ramificadas, de coloração marrom clara e com predomínio de conidiação do tipo *Cladosporium* (figura 5d), embora todos os padrões de conidiação possam ser encontrados (LACAZ et al., 2002b).

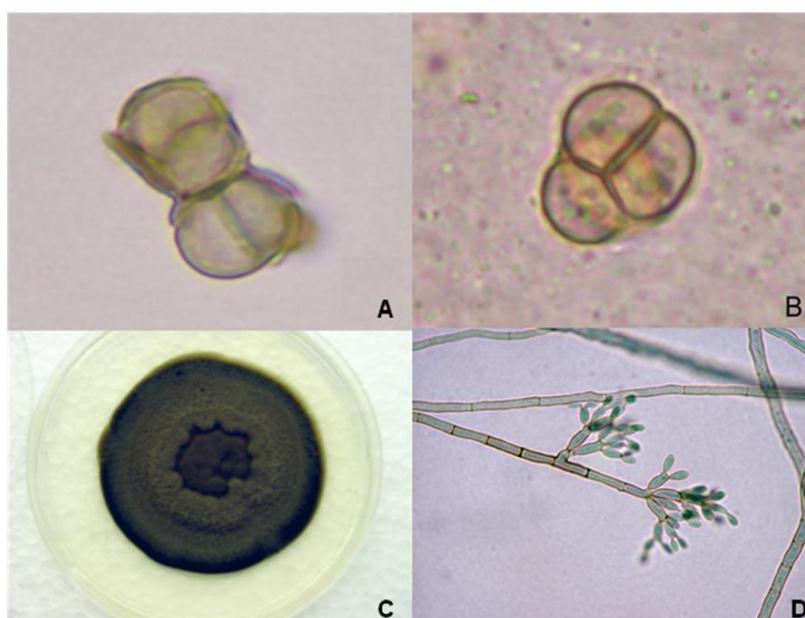
O ciclo de vida deste fungo é composto por diferentes estados morfológicos, os quais incluem estruturas de reprodução assexuada (conídios) e formas fúngicas usualmente saprofíticas (micélio) ou parasitárias (células escleróticas). Cada um destes estados morfológicos pode gerar todos os demais, exceto para a transição de células escleróticas em conídios. Os mecanismos envolvidos nas transições morfológicas de *F. pedrosoi* são ainda pouco conhecidos, embora o conhecimento do controle experimental destes processos tem aumentado nos últimos anos (SANTOS *et al.*, 2007).

Um exemplo notável deste avanço refere-se à indução de células escleróticas *in vitro*. Descobriu-se que um pH ácido de 2.5 (IBRAHIM-GRANET *et al.*, 1985) e baixas concentrações de íons  $\text{Ca}^{2+}$  (MENDOZA *et al.*, 1993) são fundamentais para a indução destas células. Posteriormente, revelou-se que o propranolol (ALVIANO *et al.*, 1992) e o Fator Ativador de Plaquetas (PAF) eram capazes de induzir células escleróticas *in vitro* em meio Butterfield, sob agitação a 37°C durante 45 dias (ALVIANO *et al.*, 2003). No entanto, esse processo demonstrou-se bastante árduo, gerando poucos estudos fisiológicos com estas formas teciduais de *F. pedrosoi* quando comparado com os outros estados morfológicos deste fungo (SANTOS *et al.*, 2007).

Em relação a este tópico, novas perspectivas foram geradas a partir da produção de meios de cultura naturais obtidos da biomassa de *Theobroma grandiflorum* *Bactrisgasipaes* (DA SILVA *et al.*, 2008), bem como de um meio quimicamente definido (pH 2.7) composto por Dextrose, Nitrato de Potássio, Fosfato de Sódio Monobásico e de Sulfato de Magnésio. Em ambos os casos reduziu-se drasticamente o tempo de indução de células escleróticas *in vitro* para 48 e 24 horas (figura 5a) respectivamente, sem a necessidade de agitação e/ou controle de temperatura (DA SILVA, 2006).

Dessa forma, a partir destes trabalhos, aspectos imunológicos da relação parasita-hospedeiro na interação de células de Langerhans (DA SILVA *et al.*, 2007) ou macrófagos peritoneais (PEREIRA, 2008) com conídios ou escleróticas de *F. pedrosoi* foram estudados, assim como a possibilidade de pesquisas que avaliem a ação de fármacos nas formas teciduais dos diferentes agentes da cromoblastomicose.

No que se refere à composição lipídica da membrana celular, sabe-se que conídios de *F. pedrosoi* apresentam alto conteúdo lipídico em relação à forma micelial, o qual não está relacionado com a quantidade total de esteróis e fosfolipídios (GOMES & RESENDE, 1992). O ácido palmítico e o ácido oléico são os principais ácidos graxos identificados na fração total de lipídios. Adicionalmente, o ácido aracdônico é identificado apenas em conídios (SOARES *et al.*, 1995). Em ambas as formas, o ergosterol é o único esterol detectado (GOMES & RESENDE, 1992). Glicose, manose, galactofuranose, raminose e glicosamina são os componentes polissacarídicos identificados em *F. pedrosoi*. A raminose é predominante em conídios enquanto que a galactose é predominante no micélio (SOARES *et al.*, 1995).



**Figura 5. Características de *F. pedrosoi*.** A) Célula esclerótica obtida *in vitro* por meio quimicamente definido e em exame micológico direto (B), ambas demonstrando coloração acastanhada, parede celular espessa e septação multiplanária. C) O Cultivo do raspado das lesões em meio Mycosel gera uma colônia com superfície aveludada e coloração verde-oliva. D) Microcultivo com conidiação do tipo *Cladosporium*. Fontes: A) Silva, 2006. B) Arquivo do Laboratório de Dermato-Imunologia .C) e D) Pereira, 2008.

*F. pedrosoi* constitutivamente produz e secreta melanina, um pigmento formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos e que se apresenta como importante fator de virulência em vários fungos patogênicos. Essa síntese de melanina em *F. pedrosoi* ocorre por meio da via do dihidroinaftaleno (DHN), em organelas denominadas melanossomos (CUNHA *et al.*, 2005; CUNHA *et al.*, 2010). Os melanossomos se fundem com a membrana celular do fungo e liberam melanina, a qual é transportada para

parede celular, onde se deposita em camadas concêntricas (FRANZEN *et al.*, 2008). O acúmulo de melanina proporciona resistência e integridade à parede celular frente a diversos compostos químicos (SANTOS *et al.*, 2007).

Estudos ultraestruturais com conídios de *F. pedrosoi* realizados por microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelam a presença de parede celular bilaminar, núcleo, várias mitocôndrias e um grande número de organelas contendo grânulos eletrodensos. Nas células escleróticas de *F. pedrosoi* observam-se grânulos na superfície após análise por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEVEC). Na MET, as células escleróticas também apresentam organelas contendo grânulos eletrodensos além de um desprendimento de material eletrodense na camada externa da parede celular. Tanto os grânulos de superfície quanto o material eletrodense referem-se possivelmente a melanina (FRANZEN *et al.*, 2006).

### 1.3 FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

Fármacos antifúngicos são aqueles que seletivamente atuam em fungos e causam toxicidade mínima ao hospedeiro. As principais classes de antifúngicos utilizados no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas são: os azóis, os poliênicos, as alilaminas e os antimetabólitos (DIXON & WALSH, 1996). Os três primeiros são os mais utilizados na prática clínica e têm em comum o mecanismo de ação voltado para a inibição da síntese ou interação direta com o ergosterol, o principal componente da membrana celular fúngica (LIANG, 2008). O ergosterol atua como um bioregulador da fluidez e da assimetria da membrana celular, contribuindo para a integridade da mesma nas células fúngicas (GHANNOUM & RICE, 1999).

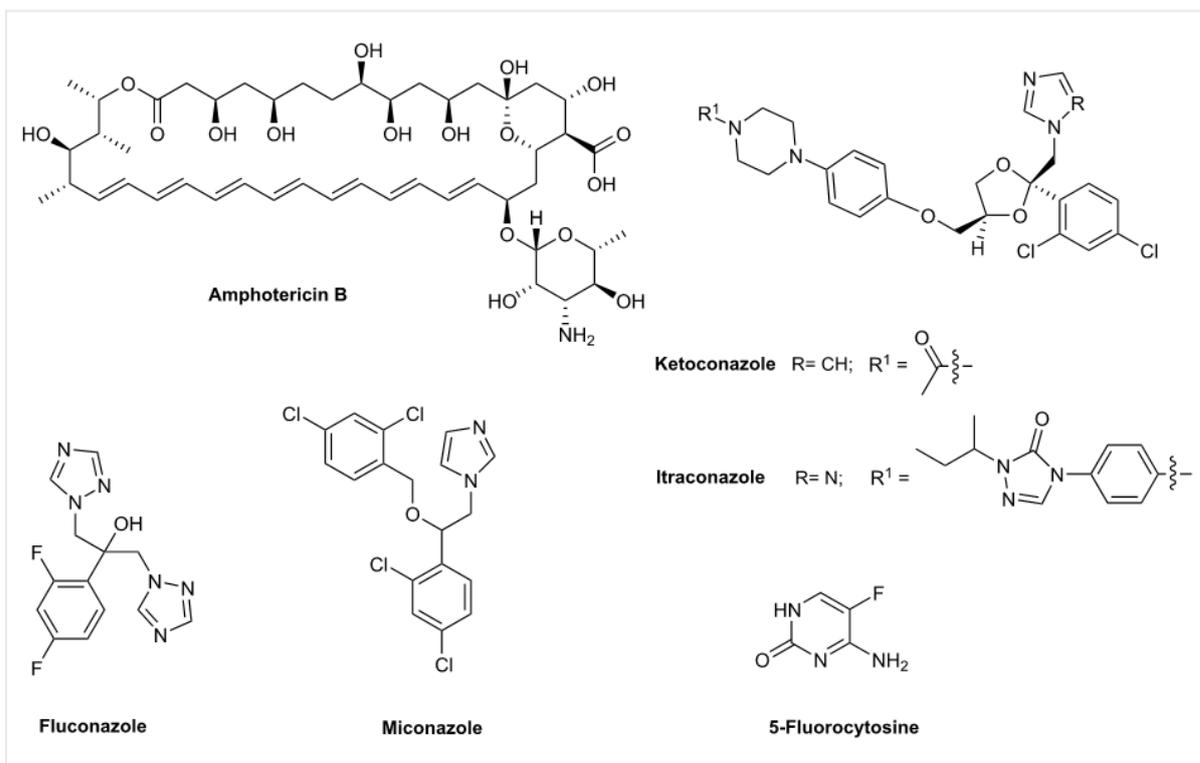
Os antifúngicos azólicos possuem anéis orgânicos de cinco membros (anel azól) e são classificados em imidazóis (miconazol e cetoconazol) ou triazóis (itraconazol, fluconazol e voriconazol) de acordo com a presença de dois ou três átomos de nitrogênio no anel azól, respectivamente (figura 6). Todos esses fármacos interferem na síntese do ergosterol por meio da inibição da enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase dependente do citocromo P450 (CYP450) fúngico (MAERTENS, 2004). A depleção do ergosterol ocorre concomitantemente com o acúmulo de precursores esteróis 14- $\alpha$  metilados, os quais interferem na fluidez e estrutura da

membrana bem como na atividade de enzimas ligadas à própria membrana, a exemplo da quitina sintase. As ações dos fármacos são refletidas na inibição do crescimento e replicação dos fungos (SHEEHAN *et al.*, 1999). Por outro lado, a inibição enzimática não ocorre de forma totalmente seletiva, gerando uma inibição cruzada de enzimas dependentes do CYP450 em mamíferos com subsequentes efeitos tóxicos, embora esses efeitos sejam significativamente menores e menos severos com os triazóis do que com os imidazóis, devido ao aumento de afinidade dos primeiros pelas enzimas fúngicas dependentes do CYP450 em concentrações terapêuticas (PIERARD *et al.*, 2000).

Em 1981, o uso sistêmico do cetoconazol foi aprovado pelo *food and drug administration* (FDA). Este fármaco, desenvolvido pela *Janssen Pharmaceutica*, por quase uma década foi considerado o padrão e o único com uma formulação oral disponível para o tratamento de micoses sistêmicas. Até a introdução terapêutica dos triazólicos o cetoconazol era indicado para o tratamento de candidíase mucocutânea crônica, blastomicose, histoplasmose e paracoccidiodomicose. Todavia, a experiência clínica com este fármaco revelou alguns pontos negativos: a absorção oral do cetoconazol demonstrou considerável variação interindividual e grande influência do pH gástrico; baixa penetração na barreira hematoencefálica; baixa efetividade em pacientes imunocomprometidos; severas complicações gastrointestinais; distúrbios endócrinos associados a altas doses e a interação imprevista com outros fármacos (MAERTENS, 2004).

O itraconazol é um fármaco triazólico sintético formado por uma mistura racêmica de 4 diastereoisômeros (2 pares enantioméricos), cada qual exibindo 3 centros quirais (GHANNOUM & RICE, 1999). É um pó branco ligeiramente amarelado, insolúvel na água, ligeiramente solúvel nos álcoois e altamente solúvel em diclorometano (DE BEULE, 1996). Apresenta amplo espectro de ação, sendo empregado no tratamento das micoses sistêmicas, como: aspergilose, blastomicose, candidíase, cromoblastomicose (ANDRADE *et al.*, 2004; DE BEDOUT *et al.*, 1997), esporotricose, histoplasmose e paracoccidiodomicose. Nas micoses superficiais é empregado no tratamento da candidíase oral e vulvovaginal, ceratite micótica, dermatofitoses, onicomicoses, pitiríase versicolor, *Tinea cruris*, *Tinea manuum* e *Tinea pedis* (PIERARD *et al.*, 2000).

O cetoconazol administrado por via oral foi substituído pelo itraconazol no tratamento de todas as micoses, exceto quando o menor custo do cetoconazol supera as vantagens do itraconazol. O itraconazol apresenta reduzida hepatotoxicidade e supressão dos corticosteróides produzida pelo cetoconazol, com expansão do espectro antifúngico. A introdução de triazólicos ainda mais modernos provavelmente irá reduzir ainda mais a utilidade do cetoconazol (SHEEHAN *et al.*, 1999).



**Figura 6. Estrutura química de alguns fármacos antifúngicos.** Anfotericina B, 5-fluorocitosina e os azóis cetoconazol, itraconazol, fluconazol e miconazol. Fonte: Liang, 2008.

O fluconazol é um fármaco triazólico fluorado obtido por síntese. Apresenta-se como pó cristalino branco, solúvel em água e insolúvel em álcool. Exerce atividade sobre várias espécies de fungos causadores de micoses profundas e mucocutâneas, como *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e várias espécies de cândida (DORNELAS-RIBEIRO *et al.*, 2012). O fluconazol é considerado terapia de escolha para o tratamento da meningite criptococcócita, porém a resposta ao fármaco é inferior ao itraconazol diante de doenças como a histoplasmose, blastomicose, esporotricose e cromoblastomicose (LACAZ *et al.*, 2002a).

A terbinafina é um agente antifúngico da classe das alilaminas. É um produto de síntese de hidrocloreto, solúvel em água e álcool. Atua principalmente na biossíntese do ergosterol, ligando-se a enzima esqualenoepoxidase e promovendo a redução ergosterol e acúmulo de esqualeno nas células fúngicas. A terbinafina não atua no sistema do citocromo CYP450. Pode apresentar ação fungistática ou fungicida. O efeito fungistático está relacionado com a síntese de esterol e o efeito fungicida é proporcionado principalmente pelo acúmulo de esqualeno, o que promove a destruição da membrana celular (BIANCALANA *et al.*, 2011; GUERRA *et al.*, 2012). É um antifúngico de amplo espectro de ação, com atividade contra patógenos importantes como *Blastomyces dermatitides*, *Histoplasma capsulatum* e *Sporothrix schenckii*, assim como os agentes da cromoblastomicose e feohifomicose (DABOIT *et al.*, 2013; DARKES *et al.*, 2003).

A 5-fluorocitosina (5-FC) é um derivado pirimidínico, obtido por síntese, quimicamente definido como pirimidina fluorada, análogo da citosina. É solúvel em água, pouco solúvel em álcool e insolúvel em clorofórmio e éter. A atividade antifúngica decorre da inibição da síntese de ácidos nucleicos. Na célula fúngica, a 5-fluorocitosina é convertida em 5-fluouracil pela enzima citosina desaminase. O produto formado é convertido a ácido 5-fluouridílico a partir do qual ocorre a síntese da 5-fluoridinatrifosfato. Esta se liga ao RNA, promovendo a síntese de proteínas anômalas. As células dos mamíferos não conseguem converter a 5-fluorocitosina em 5-fluouracil, o que mostra a especificidade do fármaco para células fúngicas (VERMES *et al.*, 2000b).

A 5-FC é um dos agentes antifúngicos mais antigos, sintetizado em 1957 como um potencial agente no combate ao câncer. Quatro anos depois, a 5-FC demonstrou ser ativa na candidíase e criptococose experimental em camundongos e em 1968 passou a ser utilizada no tratamento da candidíase e da criptococose em humanos. Além da atividade contra *Candida spp.* e *Cryptococcus neoformans*, a 5-FC é ativa contra os fungos causadores da cromoblastomicose (VERMES *et al.*, 2000a).

Nos últimos anos, uma nova geração de fármacos triazólicos tem sido desenvolvida. Posaconazol, voriconazol, ravuconazol e isavuconazol são os representantes desse novo grupo de fármacos. São agentes com um amplo espectro de atividade e com perfil farmacocinético favorável (BLYTH, 2011). Trabalhos recentes demonstram uma melhor

atividade *in vitro* do posaconazol em relação ao itraconazol frente a isolados clínicos de *Fonsecae* spp. (NAJAFZADEH *et al.*, 2010a).

#### 1.4 TRATAMENTO DA CROMOBLASTOMICOSE

O tratamento da cromoblastomicose representa um desafio, uma vez que, para grande maioria dos casos, as lesões são de difícil resolução. Várias formas de intervenção são relatadas na literatura, no entanto não existe um “padrão-ouro” de tratamento (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2012). Intervenções cirúrgicas para pequenas lesões e a crioterapia são alguns dos métodos físicos de tratamento que podem ser aplicados em lesões com estágio inicial (BONIFAZ *et al.*, 1997). Os métodos físicos mais utilizados para lesões não iniciais compreendem a termoterapia (terapia com calor ou frio) e a terapia fotodinâmica; estes métodos associados aos antifúngicos sistêmicos podem contribuir mais efetivamente para a redução do tempo de tratamento. Por exemplo, a terapia com calor na lesão promove a vasodilatação e um conseqüente aumento da difusão do antifúngico no tecido, configurando-se como um notável adjuvante terapêutico na cromoblastomicose (QUEIROZ-TELLES & SANTOS, 2013). A terapia fotodinâmica também tem demonstrado bons resultados: redução das lesões após seis aplicações, com pelo menos 80% de melhora clínica em dez pacientes. Dessa forma, a terapia fotodinâmica se configura como uma modalidade terapêutica promissora e bem tolerada (LYON *et al.*, 2011).

A terapêutica baseada em antifúngicos sistêmicos é realizada principalmente com o itraconazol, utilizado em concentrações que variam entre 100 e 400mg/dia ou em pulso terapia (UNGPAKORN & REANGCHAINAM, 2006). Alguns resultados favoráveis com o uso de Itraconazol foram obtidos no tratamento da cromoblastomicose causada por *F. pedrosoi* (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 1992; SMITH *et al.*, 1993). O segundo fármaco mais utilizado no tratamento da cromoblastomicose é a terbinafina. De acordo com os dados da literatura, as taxas de cura com estes fármacos variam entre 15% e 80%, dependendo do agente etiológico, severidade da doença e o critério de cura utilizado (QUEIROZ-TELLES & SANTOS, 2013). Outros fármacos empregados no tratamento incluem a anfotericina-B e a 5-fluorocitosina (VITALE *et al.*, 2003), com estudos demonstrando diferentes graus de sucesso, além dos tratamentos serem longos e dispendiosos (ESTERRE *et al.*, 1996b).

Sabe-se que o sucesso terapêutico depende de vários fatores, tais como: diversidade do agente etiológico, tipo de lesão, susceptibilidade às drogas e estado clínico do

paciente (LOPEZ & MENDEZ TOVAR, 2007).O tamanho da lesão é algo relevante, uma vez que lesões pequenas podem ser tratadas com meios físicos, cirurgias convencionais a laser ou através do calor (BONIFAZ *et al.*, 1997) . Associações de terapias têm apresentado bons resultados, como por exemplo, a combinação de itraconazol com a terbinafina (GUPTA *et al.*, 2002) , anfoteracina-B com 5-fluorocitosina , raspagem e crioterapia (POIRRIEZ *et al.*, 2000), 5-fluorocitosina e itraconazol, empregada para redução máxima das lesões, seguida de termoterapia (BONIFAZ *et al.*, 2004). Vários autores indicam o itraconazol como a melhor escolha, o qual empregado nas doses diárias de 200 a 400 mg é eficaz e bem tolerado pelos pacientes. Ungpakorn (2006), demonstrou que o pulso de 400 mg deste medicamento é mais econômico e apresenta melhores resultados do que o tratamento convencional de 200 ou 400 mg, embora a duração do tratamento dependa dos casos individuais.

Com o passar do tempo, as lesões dos pacientes com cromoblastomicose tornam-se fibróticas, impedindo a chegada dos agentes antifúngicos no sítio de infecção. Nesse sentido, as terapias imunomoduladoras constituem uma estratégia interessante no manejo de formas severas da doença (QUEIROZ-TELLES & SANTOS, 2013). O uso de fármacos imunostimulantes, a exemplo das glucanas (beta-1,3-poliglicose extraídas de *Saccharomyces cerevisiae*), como terapia adjuvante em pacientes com cromoblastomicose, é relatado em um caso severo e disseminado de cromoblastomicose com um padrão de ativação Th2 (alta produção de IL-10 e baixos níveis de INF- $\gamma$ ). A associação de glucana com o itraconazol por seis meses promoveu um aumento na produção INF- $\gamma$  e redução de IL-10. Dessa forma, houve uma melhora da resposta imune celular do paciente permitindo uma redução das lesões (AZEVEDO *et al.*, 2008).

O posaconazol figura dentre os fármacos triazólicos de segunda geração como uma opção atrativa para os casos severos ou formas refratárias de cromoblastomicose. Na forma de solução oral apresenta um perfil farmacocinético e farmacodinâmico melhor do que o itraconazol em cápsulas. Por outro lado, o uso do voriconazol tem sido associado com alguns eventos adversos como dermatite fotosensitível e alterações visuais embora bons resultados já tenham sido descritos no tratamento de casos refratários de cromoblastomicose (QUEIROZ-TELLES & SANTOS, 2013).

### 1.5 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* À AGENTES ANTIFÚNGICOS

Em 1982, nos Estados Unidos, um subcomitê de peritos foi organizado para se tentar padronizar as provas de susceptibilidade de fungos a fármacos antifúngicos de emprego corrente, no tratamento de micoses profundas. Dois estudos multicêntricos, já haviam demonstrado variabilidade inaceitável nos resultados obtidos de CIM para anfotericina B, 5-FC e cetoconazol, em relação a leveduras estudadas em diferentes concentrações. A discordância de resultados foi atribuída pelos autores à falta de padronização dos métodos. A composição do meio de cultivo, o pH do meio, o tempo e temperatura de incubação, o tamanho do inóculo e o critério de leitura constituíram alguns dos fatores atribuídos a esses resultados discordantes. O documento M27-T do CLSI (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais), selecionou após 14 anos de várias pesquisas, alguns dos principais estudos que forneceram dados para adequada padronização das provas de susceptibilidade de leveduras a antifúngicos (LACAZ *et al.*, 2002a).

Em 2002, o CLSI criou a norma de referência M38-A, voltada para os fungos filamentosos (FOTHERGILL *et al.*, 2009;VITALE *et al.*, 2009). Em 2008, esta norma foi atualizada para uma nova versão, a M38-A2 (CLSI, 2008). O documento ressalta as condições de teste, incluindo a preparação e o tamanho do inóculo, o tempo e a temperatura de incubação, a formulação do meio e os critérios para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Esta é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microorganismo no teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo.

Atualmente não existe uma padronização para a determinação da suscetibilidade *in vitro* bem como pontos de corte definidos para fungos melanizados. Os dados disponíveis na literatura são escassos e geralmente englobam um pequeno número de isolados por espécie (REVANKAR & SUTTON, 2010). Nesse sentido, os primeiros estudos voltados para determinação suscetibilidade *in vitro* de *F. pedrosoi* foram baseados em adaptações na técnica de macrodiluição do CLSI proposta para leveduras (CALIGIORNE *et al.*, 1999;DE BEDOUT *et al.*, 1997) . Estes trabalhos pioneiros revelaram que os isolados de *F. pedrosoi* eram sensíveis ao itraconazol, mas apresentavam altos valores de CIM para o fluconazol, anfotericina B e 5-fluorocitosina (QUEIROZ-TELLES & SANTOS, 2013).

Os dados mais recentes da literatura em relação à suscetibilidade de *Fonsecaea* spp. são baseados na norma M38-A2 (BIANCALANA *et al.*, 2011;DABOIT *et al.*, 2013;NAJAFZADEH *et al.*, 2010a). É necessário frisar que a correlação entre os dados *in vitro* e *in vivo* ainda não está estabelecida, embora o trabalho de Andrade *et al.* (2004) sugira uma correlação entre os dados obtidos *in vitro* com o curso clínico dos pacientes. A determinação dos perfis de suscetibilidade é de grande interesse para os casos onde os pacientes não respondem ou apresentam uma resposta insuficiente ao tratamento.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar as alterações celulares em conídios de *Fonsecaea pedrosoi* após tratamento *in vitro* com itraconazol, cetoconazol, fluconazol, terbinafina e 5-fluorocitosina.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a susceptibilidade *in vitro* ao itraconazol, cetoconazol, fluconazol e terbinafina em isolados clínicos de *F. pedrosoi*.

- Analisar alterações morfológicas em conídios de *F. pedrosoi* induzidas por itraconazol, terbinafina e 5-fluorocitosina na respectiva Concentração Inibitória Mínima e em altas concentrações.

- Avaliar alterações ultraestruturais em conídios de *F. pedrosoi* induzidas por 5-fluorocitosina.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PACIENTES E ESQUEMAS TERAPÊUTICOS

A população alvo consistiu de 20 pacientes com diagnóstico de cromoblastomicose por *Fonsecaea pedrosoi* atendidos no Centro de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária do Estado do Pará Dr. Marcello Candia (URE MC), sediado no município de Marituba, Pará. Participaram do estudo indivíduos de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos, domiciliados na cidade de Belém ou interior do Estado do Pará, em uso de itraconazol 200 a 400 mg/dia.

#### 3.2 COLETA DE MATERIAL E AMOSTRAS FÚNGICAS

As cepas de *F. pedrosoi* foram isoladas em meio de cultura Micosel<sup>®</sup> (Becton Dickson, EUA) a partir do material biológico obtido de raspados das lesões dos pacientes participantes do estudo. As raspagens foram realizadas nos bordos das lesões, principalmente em regiões com pontos enegrecidos. A coleta de material é parte do Exame Micológico Direto (EMD), procedimento padrão para o diagnóstico e posterior tratamento dos pacientes. O material obtido foi observado em microscópio óptico, por meio de lâmina, lamínula e KOH 20%, onde identificou-se as células escleróticas ou muriformes. As cepas isoladas foram mantidas em meio Ágar-Sabouraud (Merck, Alemanha) a temperatura ambiente. A identificação do agente etiológico foi realizada pela macroscopia da colônia obtida e pelo microcultivo em lâmina.

#### 3.3 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

As cepas foram cultivadas em Ágar-batata (Merck, Alemanha) por um tempo mínimo de 7 dias para preparação do inóculo. A superfície das colônias foram gentilmente raspadas com alça microbiológica em soro fisiológico 0.85% contendo Tween 20 (Synth, São Paulo, Brasil) 0.05%. A suspensão fúngica resultante foi transferida da superfície das colônias para tubo tipo Falcon (BD, EUA) de 15ml e agitada em vórtex (Phoenix, Brasil) por 30 segundos para desagregar os conídios dos conidióforos. Em seguida, a suspensão foi filtrada em membrana de nylon, para a retenção das hifas e submetida à centrifugação de 2500rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o volume final da suspensão foi ajustado para uma densidade óptica (DO) a 530 nm entre 0.15 e 0.17 (NAJAFZADEH *et al.*, 2011c), o que correspondeu a uma faixa de  $10^5$ - $10^6$  células/mL, após contagem em câmara de Neubauer. A suspensão obtida foi diluída 1:50 em RPMI (Sigma, St.Louis, EUA) tamponado com MOPS

(ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico) (Amresco, Ohio, EUA) até um pH de  $7,0 \pm 0,1$  em temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ . As diluições de inóculo 1:50 corresponderam a 2X a densidade necessária de  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL, aproximadamente. O inóculo do teste foi produzido em quantidade suficiente para inocular 0,1mL da suspensão diluída diretamente em cada poço da placa de microtitulação (Kartell S.P.A., Milão, Itália).

### 3.4 PREPARAÇÃO DOS AGENTES ANTIFÚNGICOS

Os agentes antifúngicos foram preparados em concentrações 100X as concentrações finais desejada nos testes de susceptibilidade *in vitro*. Para o itraconazol (Sigma, St.Louis, EUA), cetoconazol (Sigma, St.Louis, EUA) e a terbinafina (Sigma, St.Louis, EUA) as concentrações corresponderam de 1.600 a  $3,13\mu\text{g/mL}$  diluídas em Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St.Louis, EUA). Posteriormente cada concentração foi diluída 1:50 em RPMI (Sigma, St.Louis, EUA) tamponado com MOPS, atingindo concentrações de 32 a  $0,0625\mu\text{g/mL}$ , 2X a concentração final desejada para estes fármacos. O fluconazol (Sigma, St.Louis, EUA) foi preparado e diluído em água destilada estéril em intervalos de concentrações de 6.400 a  $12,5\mu\text{g/mL}$ , atingindo o intervalo de 128 a  $0,25\mu\text{g/mL}$  após diluição 1:50 com o RPMI tamponado com MOPS. Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  de cada uma das dez concentrações foram inoculados em placa de microtitulação com 96 poços. Todas as placas foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da utilização.

### 3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A preparação do inóculo, dos agentes antifúngicos e a determinação da CIM foram realizadas de acordo com as determinações do CLSI, por meio da norma M38-A2. No dia da realização dos testes, a cada concentração intermediária dos fármacos nos poços foi acrescido 100  $\mu\text{L}$  do inóculo de conídios. Dessa forma, a concentração final analisada para o itraconazol, o cetoconazol e a terbinafina foi de 16 a  $0,03\mu\text{g/mL}$  e de 64 a  $0,125\mu\text{g/mL}$  para o fluconazol. A CIM para cada fármaco utilizado foi obtida após cinco dias de incubação a  $30^{\circ}\text{C}$ , sendo definida como a mínima concentração do fármaco capaz de reduzir em 100% o crescimento visual do fungo quando comparado com o grupo controle (não tratado). Os poços do controle de crescimento contiveram 100  $\mu\text{L}$  da correspondente solução diluída de inóculo e 100  $\mu\text{L}$  do diluente a 2% do fármaco sem agente antifúngico. *Candida parapsilosis* ATCC<sup>®</sup> 22019 e *Candida Krusei* ATCC<sup>®</sup> 6258 foram utilizados como cepas de referência no controle de qualidade dos testes de suscetibilidade *in vitro*.

### 3.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Os conídios foram tratados com a CIM para o itraconazol e a terbinafina e com as concentrações de 16, 32 e 64 µg/mL em placas de 24 poços (TPP, Suíça). Os volumes finais do inóculo, do itraconazol e da terbinafina foram ajustados para 1mL, com o intuito de se obter uma maior quantidade de fungo para observação em microscopia óptica e eletrônica. Após 5 dias de incubação a 30°C, os conídios foram retirados, centrifugados a 2500 rpm e lavados com água destilada estéril. Cerca de 15µL da suspensão resultante foi colocado entre lâmina e lamínula e posteriormente observado em microscópio óptico (Axio Scope A1, Carl Zeiss, Alemanha). As fotos foram obtidas com câmera modelo MRc (13 Mega Pixels) (Carl Zeiss, Alemanha).

### 3.7 DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO DOS CONÍDIOS

O diâmetro dos conídios não tratados (recém isolados) e tratados na CIM para o itraconazol ou terbinafina foi medido pelo software AxioVision Release versão 4.8.2 (Carl Zeiss MicroImaging, Alemanha). Foram contabilizadas 200 medidas para cada grupo analisado, utilizando as fotos obtidas com câmera modelo MRc (13 Mega Pixels) (Carl Zeiss, Alemanha).

### 3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para a realização da Microscopia eletrônica de varredura, as amostras fúngicas foram colhidas e lavadas 02 vezes em tampão PBS, pH 7.2 e fixadas a overnight a 4°C em uma solução contendo 1% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1M e pH 7.2. Após esse tempo, as células foram aderidas em lamínulas previamente recobertas com poli-L-lisina e novamente lavadas 03 vezes no mesmo tampão e pós-fixadas em solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>), 0,8% de ferricianeto de potássio 5mM, CaCl<sub>2</sub> 5mM em tampão cacodilato 0,1M pH 7.2 à temperatura ambiente por uma hora, lavadas 3 vezes no mesmo tampão e desidratadas com passagem em uma série de acetona em água a 20, 30, 50, 70, 90% e 100%, com tempo de 30 minutos para cada etapa e duas vezes em etanol 100% e passadas por um processo de secagem por ponto crítico de CO<sub>2</sub>. A seguir as lamínulas foram fixadas em suporte para amostra (“stub”), recobertas com ouro (aproximadamente 2nm de espessura), e após a metalização utilizando aparelho Emitech K550-England foram observadas em Microscópio eletrônico de varredura Leo 1450VP.

### 3.9 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará, sob o protocolo n° 081/07 CEP-ICS/ UFPA.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar os valores dos diâmetros obtidos, comparando-se o grupo não tratado com os grupos tratados na CIM para o itraconazol ou terbinafina, utilizando o programa GraphPad® 5. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de  $p < 0.05$ .

#### 4. RESULTADOS

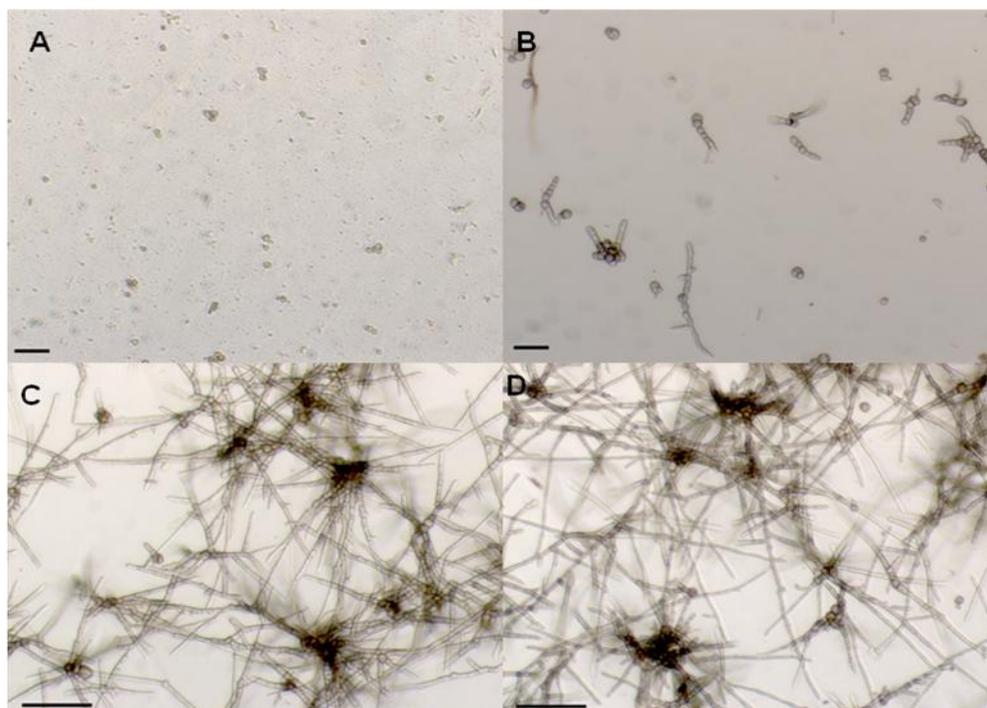
Ao exame micológico direto, todas as amostras provenientes dos pacientes envolvidos no estudo foram positivas para células escleróticas. A média de idade desses pacientes foi de 59.3 anos. Em todos os 20 isolados, *F. pedrosoi* foi identificado como o agente etiológico, com base na macro e micromorfologia das colônias isoladas. A forma clínica nodular foi predominante (75 % dos isolados), seguida por 3 pacientes com lesões em placa e 2 pacientes com a forma anular (tabela 1). Os pacientes estavam em tratamento com itraconazol 200 ou 400 mg/dia.

TABELA 1. Características demográficas, forma clínica e agente etiológico isolado de 20 pacientes de cromoblastomicose.

Paciente	Sexo	Idade	Agente etiológico	Forma clínica
1	M*	75	<i>F. pedrosoi</i>	Placa
2	M	60	<i>F. pedrosoi</i>	Nodular
3	M	76	<i>F. pedrosoi</i>	Placa
4	M	74	<i>F. pedrosoi</i>	Nodular
5	M	54	<i>F. pedrosoi</i>	Nodular
6	M	75	<i>F. pedrosoi</i>	Nodular
7	M	54	<i>F. pedrosoi</i>	Nodular
8	M	57	<i>F. pedrosoi</i>	Nodular
9	M	60	<i>F. pedrosoi</i>	Nodular
10	M	30	<i>F. pedrosoi</i>	Nodular
11	M	58	<i>F. pedrosoi</i>	Placa
12	M	58	<i>F. pedrosoi</i>	Nodular
13	M	33	<i>F. pedrosoi</i>	Anular
14	M	81	<i>F. pedrosoi</i>	Nodular
15	M	71	<i>F. pedrosoi</i>	Anular
16	M	69	<i>F. pedrosoi</i>	Nodular
17	M	63	<i>F. pedrosoi</i>	Nodular
18	M	48	<i>F. pedrosoi</i>	Nodular
19	M	39	<i>F. pedrosoi</i>	Nodular
20	M	52	<i>F. pedrosoi</i>	Nodular

\*M: masculino. Forma clínica de acordo com Salgado et al. 2011.

Os resultados dos testes de sensibilidade revelaram que na concentração de 16µg/mL para o itraconazol e o cetoconazol, os conídios apresentaram tamanho menor em relação aos conídios na CIM (figura 7a), os quais formaram hifas pequenas e mais pigmentadas (figura 7b). No grupo controle, no grupo tratado com DMSO e nos grupos com concentrações menores que a CIM observou-se o crescimento visual, com formação de longas hifas (figura 7c e 7d).



**Figura 7. Determinação da CIM para o itraconazol.** Na concentração de 16 µg/mL (A) e na CIM de 0.25 µg/mL (B) para o isolado 12 ocorre a inibição do crescimento visual, porém na CIM ocorre a formação de pequenas hifas, diferentemente da concentração de 0.125 µg/mL, logo abaixo da CIM (C) e do grupo controle (D) onde ocorre a formação de longas hifas pigmentadas. Barra: 50 µm em A e B. 100 µm em C e D.

Todos as cepas isoladas foram sensíveis ao itraconazol e ao cetoconazol após 5 dias de incubação a 30°C, com CIMs variando de 0.25 a 1 µg/mL e de 0.5 a 4µg/mL, respectivamente (tabela 2). Quando se compara estes dois fármacos nota-se que o itraconazol apresentou menores valores de CIM (CIM<sub>90</sub> = 1µg/mL) do que o cetoconazol (CIM<sub>90</sub> = 4µg/mL).

Em relação a terbinafina, 15 cepas (75 %) apresentaram valores de CIM  $\geq$  0.5 µg/mL e 19 cepas (95%) foram resistentes ao fluconazol (CIM  $\geq$  64 µg/mL) (tabela 2). Observou-se valor de CIM para a terbinafina  $>$ 16 µg/mL nos isolados 15 e 16, onde notou-se a formação de grumos com intensa pigmentação (figura 8b).

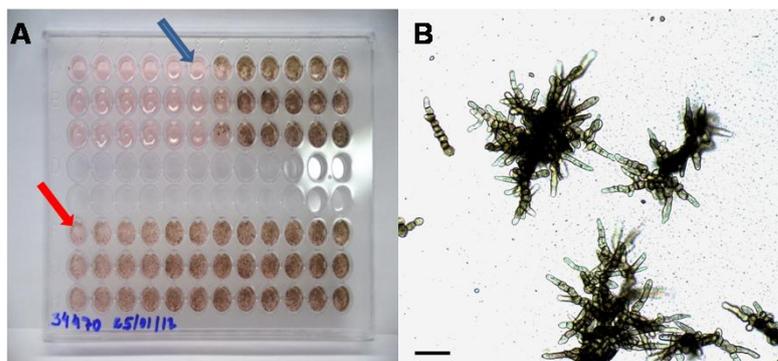
Na CIM para o itraconazol os conídios apresentaram diâmetro maior ( $4.22 \pm 0.68$ , figura 9a, figura 10) do que os conídios não tratados ( $2.39 \pm 0.40$  µm, figura 9b, figura10) ou tratados com a terbinafina na CIM ( $2.72 \pm 0.46$  µm, figura 10). Os dados são expressos em média aritmética  $\pm$  desvio padrão em relação a 200 medidas de cada um dos grupos

analisados. Em alguns campos os conídios formaram cadeias. Também se observou a presença de conídios em processo de divisão (figura 9a).

TABELA 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM), CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub> e Média Geométrica para 20 cepas isoladas de pacientes com cromoblastomicose.

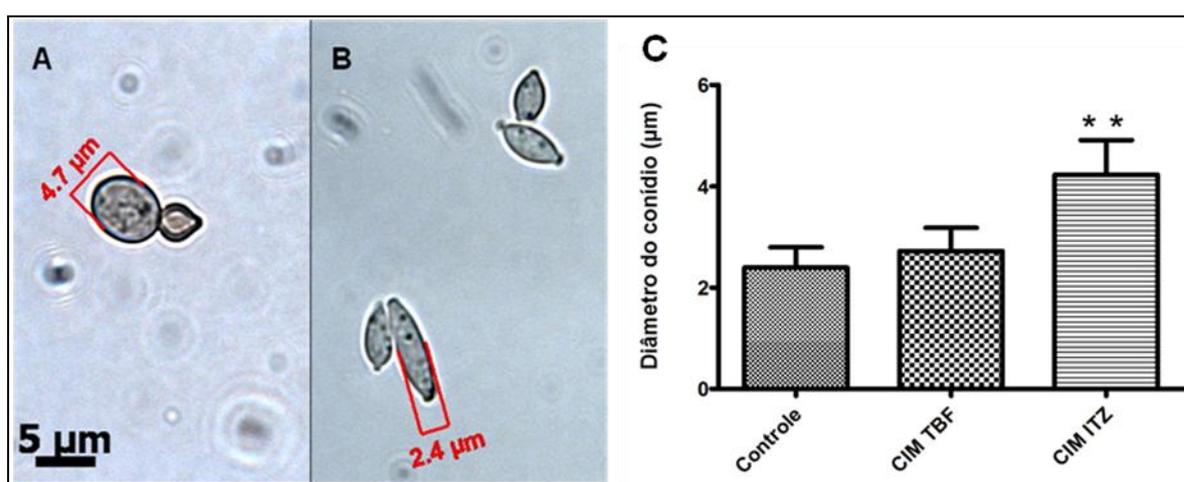
Cepa	CIM (µg/mL)			
	ITZ	TBF	CTZ	FCZ
1	1	0.5	1	64
2	1	0.5	1	64
3	0.25	4	0.5	>64
4	0.5	2	2	>64
5	0.5	1	1	64
6	0.5	0.25	1	64
7	1	0.25	1	64
8	0.5	0.25	0.5	>64
9	1	0.5	4	>64
10	0.5	0.5	1	64
11	0.5	0.5	1	64
12	0.25	0.25	0.5	64
13	0.5	0.5	1	64
14	0.125	0.125	0.5	64
15	0.5	>16	4	>64
16	0.5	>16	4	>64
17	1	1	1	>64
18	1	0.5	1	64
19	0.5	4	1	>64
20	0.25	0.5	0.5	32
Varição	0.25 - 1	0.125 - >16	0.5 - 4	32 - > 64
CIM <sub>50</sub>	0.5	0.5	1	64
CIM <sub>90</sub>	1	4	4	> 64
Média Geométrica	0.5341	0.7937	1.0682	60.6769

ITZ: Itraconazol. TBF: terbinafina. CTZ: Cetoconazol e FCZ: fluconazol. O número de identificação de cada cepa corresponde ao número de identificação do paciente.



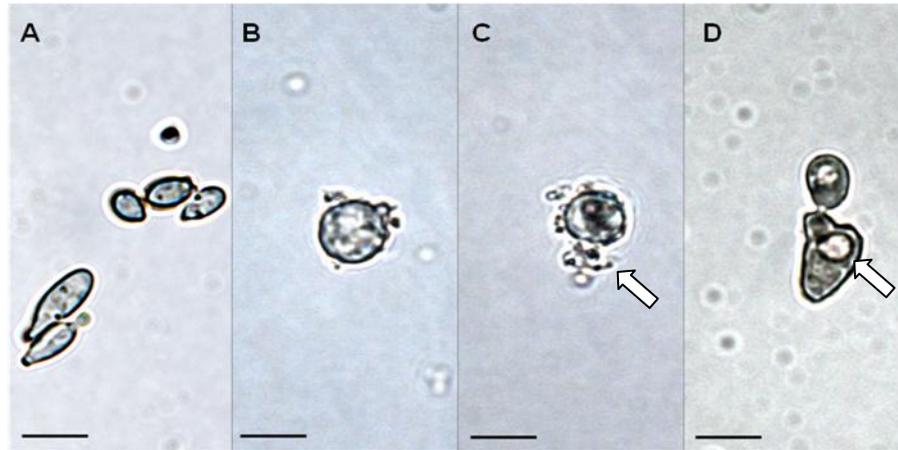
**Figura 8.** Teste de susceptibilidade *in vitro* ao itraconazol e a terbinafina. Teste de susceptibilidade *in vitro* do isolado 15, mostrando a CIM para o itraconazol (seta azul, 0.5 µg/mL). Com a terbinafina ocorreu o crescimento na maior concentração utilizada (16 µg/mL) (seta vermelha em A), com a presença de grumos altamente pigmentados e a formação de hifas (B). Barra: 50 µm

Os experimentos subsequentes foram focados na busca de alterações morfológicas nos conídios tratados com itraconazol ou terbinafina na CIM e em 16  $\mu\text{g/mL}$ , após 5 dias de incubação a 30°C. Alterações celulares foram encontradas em conídios tratados com itraconazol 16  $\mu\text{g/mL}$  por 5 dias. Essas alterações incluem a formação de vacúolos, irregularidade no contorno celular e o desprendimento de material pigmentado da parede celular (figura 10). Raramente foram observados conídios amorfos ou com rompimento da parede celular nesta concentração. Em relação à terbinafina, não foi observado alteração significativa na morfologia dos conídios na CIM e na concentração de 16  $\mu\text{g/mL}$ .

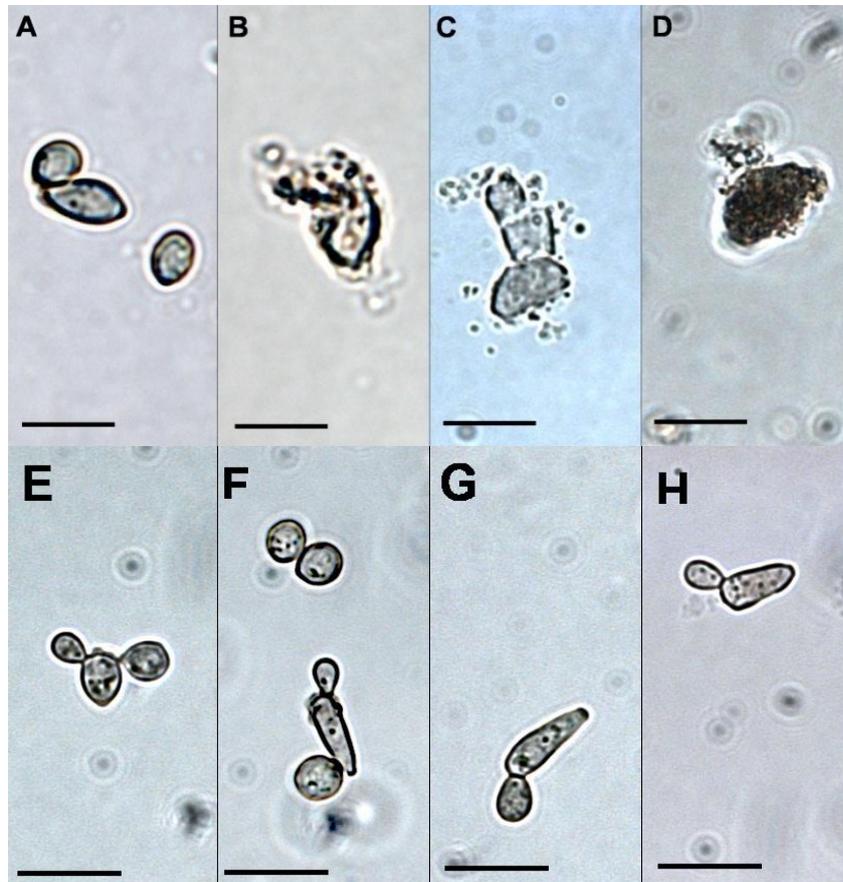


**Figura 9. Comparação entre os conídios na CIM com conídios não tratados.** Conídios tratados com itraconazol (A) na CIM apresentaram diâmetro maior ( $4.22 \pm 0.68$ ) do que os conídios não tratados ( $2.39 \pm 0.40$ ) (B)  $p < 0.01$ . Na CIM para terbinafina não se observou aumento significativo no diâmetro do conídio. Os dados são representativos de 200 medidas, apresentados como média aritmética  $\pm$  desvio padrão. \*\*  $p < 0.01$

A morfologia de conídios após o tratamento com concentrações maiores que as utilizadas nos testes de susceptibilidade foi analisada. Na concentração de 32  $\mu\text{g/mL}$  para o itraconazol observou-se a ruptura da parede celular em algumas células (figuras 11 B-C), assim como *debris* celulares espalhados pelo poço das placas. Nesta mesma concentração, conídios tratados com terbinafina não demonstraram alteração morfológica significativa (figura 12 F-H), mantendo-se similares aos conídios não tratados (figura 12E).

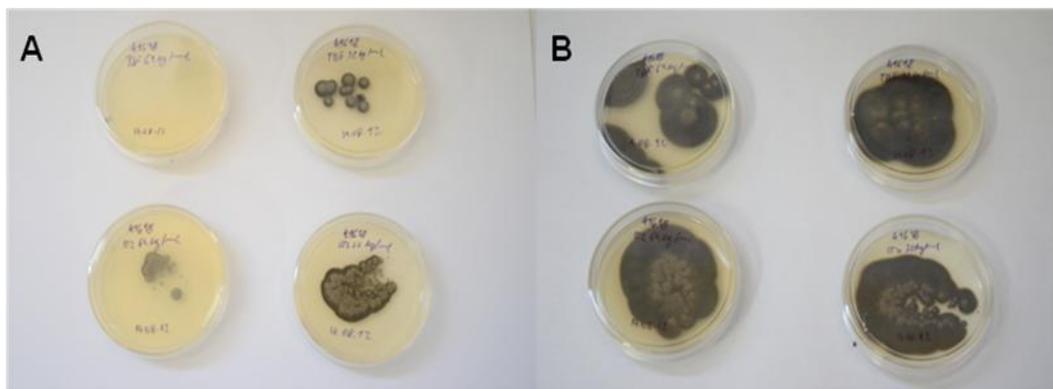


**Figura 10. Alterações morfológicas induzidas por itraconazol 16 µg/mL em conídios.** Conídios não tratados (A) e conídios tratados com itraconazol 16 µg/mL (B-D), onde se observa o contorno irregular (B), o desprendimento de material pigmentado da parede celular (seta branca em C) e a formação de vacúolo (seta branca em D). Barra (A-D): 10 µm



**Figura 11. Conídios tratados com altas concentrações de itraconazol e terbinafina.** Conídios não tratados (A) e conídios tratados com itraconazol 32 µg/mL (B e C) e 64 µg/mL (D). Em B e C foi possível notar a ruptura de alguns conídios enquanto que em D alguns conídios tornaram-se disformes. (E) conídios tratados com a CIM para terbinafina e nas concentrações de 16 µg/mL (F), 32 µg/mL e 64 µg/mL (H), mostrando que não ocorrem alterações morfológicas significativas. Barra (A-D): 5µm e (E-H): 10 µm.

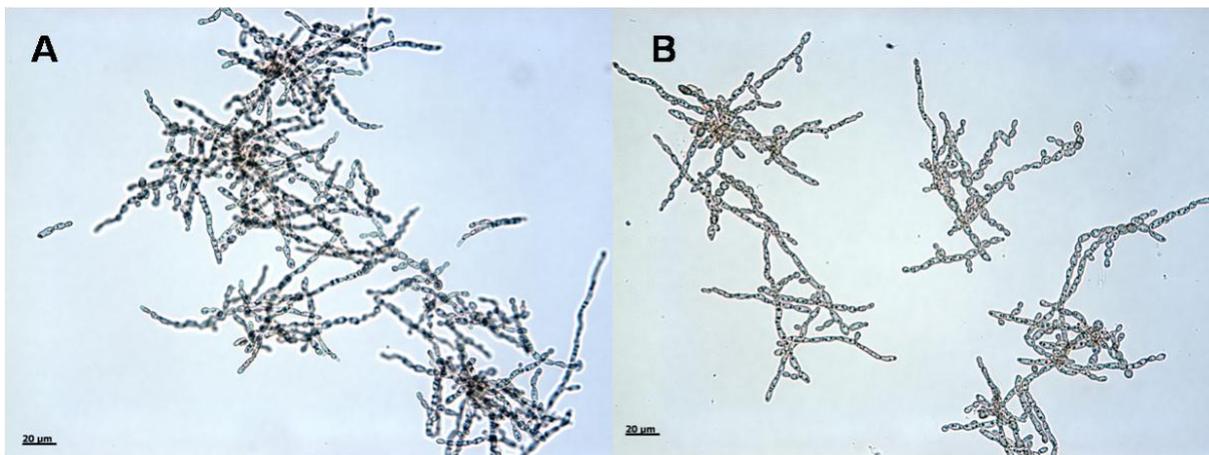
Na concentração de 64  $\mu\text{g/mL}$  para o itraconazol foi observado uma maior quantidade de *debri* celulares, bem como a presença de conídios com rompimento da parede celular (figura 11D). Também foi observada a formação de uma massa disforme acastanhada, possivelmente conídios em um alto grau de destruição celular.



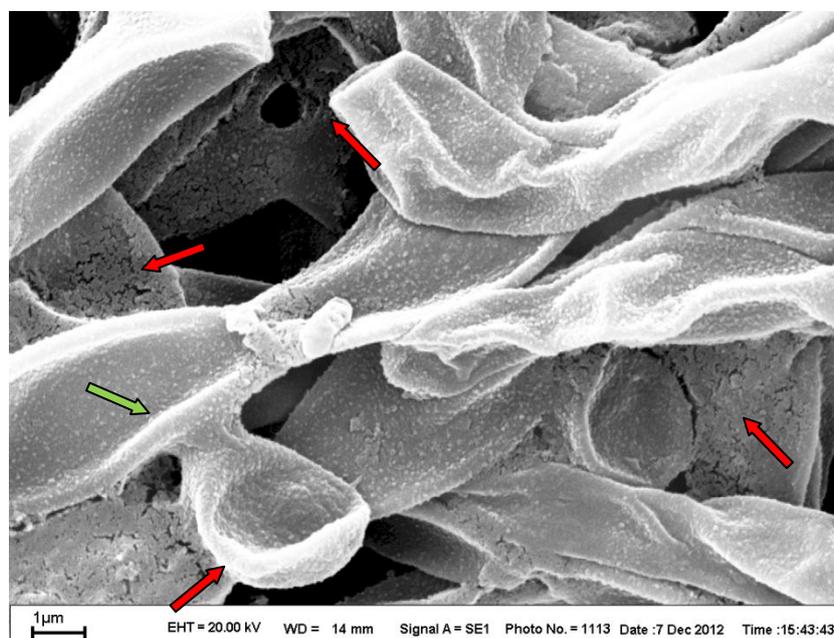
**Figura 12. Crescimento de colônias após tratamento com itraconazol e terbinafina em altas concentrações.** Após 15 (A) e 30 dias (B) de cultivo a 30°C observou-se o crescimento de colônias em Ágar-Sabouraud, a partir de conídios tratados com itraconazol ou terbinafina nas concentrações de 32  $\mu\text{g/mL}$  (lado direito em cada foto) e 64  $\mu\text{g/mL}$  (lado esquerdo em cada foto).

Nas concentrações de 32  $\mu\text{g/mL}$  e 64  $\mu\text{g/mL}$ , tanto para o itraconazol quanto para a terbinafina, foi possível notar conídios com morfologia aparentemente preservada após o tratamento por 5 dias a 30°C, indicando uma variação de sensibilidade dos conídios à estes fármacos dentro de uma mesma cepa. Estes conídios possivelmente foram os responsáveis pelo crescimento de colônias após o subcultivo em Ágar-Sabouraud (figura 12).

Adicionalmente, foi analisado o comportamento dos conídios frente a altas concentrações de 5-FC. Nas concentrações de 32  $\mu\text{g/mL}$  e 64  $\mu\text{g/mL}$  não ocorreu inibição de crescimento, sendo observada a formação de hifas septadas após 5 dias de tratamento. No entanto, as hifas cresceram de forma irregular, tortuosa, possivelmente devido à ação do fármaco. Na microscopia eletrônica de varredura foi observado um rompimento na estrutura fúngica em diferentes pontos, após tratamento com 5-FC 64  $\mu\text{g/mL}$  por 5 dias (figura 13). As hifas apresentaram um aspecto achatado na superfície (seta verde, figura 13).



**Figura 13. Conídios tratados com 5-FC.** Conídios tratados com 5-FC na concentração de 32 µg/mL (A) e 64 µg/mL(B). Barra: 20 µm



**Figura 14. Eletromicrografia de varredura após tratamento com 5-FC 64 µg/mL.** Vários pontos de fragmentação na estrutura fúngica são observados (setas vermelhas).

## 5. DISCUSSÃO

O trabalho retrospectivo de Silva *et al.* (1998) revelou que o Estado do Pará é uma das regiões com maior prevalência de casos de cromoblastomicose no mundo, com a segunda maior casuística de acordo com Salgado *et al.* (2005), atrás apenas de Madagascar. No entanto, estudos que estabeleçam a susceptibilidade *in vitro* de isolados clínicos de pacientes acometidos pela cromoblastomicose no Estado do Pará ainda não tinham sido realizados.

O itraconazol demonstrou melhor atividade *in vitro* dentre os antifúngicos azólicos utilizados neste estudo, uma vez que apresentou menor valor de CIM<sub>90</sub>. De fato, o itraconazol apresenta uma boa resposta *in vitro* contra dermatófitos, leveduras e fungos dematiáceos (MCGINNIS & PASARELL, 1998). Entretanto, é necessário ressaltar que os métodos utilizados para a determinação da susceptibilidade *in vitro* foram sendo aperfeiçoados ao longo da última década e que não existe ainda uma clara relação entre os resultados obtidos com a evolução clínica dos pacientes (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011).

Bedout *et al.* (1998) realizaram um dos primeiros trabalhos para a determinação da CIM em isolados de *F. pedrosoi*, utilizando como metodologia a macrodiluição em caldo proposta na época pelo CLSI para o teste de sensibilidade de leveduras, adaptando-as para fungos filamentosos. Como não havia informações sobre resistência de *F. pedrosoi* a fármacos azólicos foi definido arbitrariamente como resistente os isolados com CIM excedente ao pico plasmático destes fármacos atingidos durante o tratamento (20 µg/mL para o fluconazol e 10 µg/mL para o itraconazol). Dessa forma, determinou-se que em 12 isolados de *F. pedrosoi* 66.7 % eram resistentes ao fluconazol e nenhum destes era resistente ao itraconazol.

Caligiorne *et al.* (1999), por meio desta metodologia, determinaram a CIM para 19 isolados de fungos dematiáceos, dos quais 6 eram *F. pedrosoi*. Por outro lado, o ponto de corte para resistência aos antifúngicos azólicos foi considerado o mesmo determinado pelo CLSI para *Candida* spp. , sendo  $\geq 1$  µg/mL para o itraconazol e  $\geq 64$  µg/mL para o fluconazol. Todos os isolados de *F. pedrosoi* foram sensíveis ao itraconazol e apenas um foi resistente ao fluconazol. Este mesmo trabalho afirma que um inóculo formado por suspensão de conídios livre de hifas produz resultados mais confiáveis e reprodutivos. Adicionalmente, os trabalhos

de Bedout *et al.* (1998) e Caligiorne *et al.* (1999) utilizaram um período de incubação de 5 dias em temperaturas de 22-24 °C.

Em 2002, o CLSI criou um método de referência (norma M38-A) para testes de microdiluição em caldo com o intuito de determinar a sensibilidade de fungos filamentosos, frente a fármacos antifúngicos. Por meio deste, alguns trabalhos foram desenvolvidos com fungos causadores da cromoblastomicose, como o de Vitale *et al.* (2009) com isolados clínicos e ambientais de *C. carrionii* e *C. yegresii*. Neste trabalho todos os isolados foram susceptíveis ao itraconazol e a terbinafina, com atividade reduzida em relação ao fluconazol. No trabalho de Fothergill *et al.* (2009) 160 isolados clínicos de *Exophiala* spp. foram susceptíveis ao itraconazol, voriconazol e posaconazol, sendo este último o de melhor atividade, por apresentar valores menores de CIM.

A norma M38-A foi atualizada para a segunda versão, a M38-A2, em 2008. Utilizando esta nova versão, Najafzadehet *al.*(2010) obtiveram resultados similares aos de Fothergillet *al.* (2009) para *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F.nubica*. Todos os isolados testados apresentaram  $CIM_{90s} \leq 0.5 \mu\text{g/mL}$  para o itraconazol, posaconazol, voriconazol e isavuconazol. Neste estudo, *F. pedrosoi* apresentou  $CIM_{90}$  igual a 32  $\mu\text{g/mL}$  para o fluconazol e igual a 0.125  $\mu\text{g/mL}$  para o itraconazol.

Utilizando como base a norma M38-A2, pode-se observar valores maiores de  $CIM_{90}$  para o itraconazol (1 $\mu\text{g/mL}$ ) e o fluconazol (>64  $\mu\text{g/mL}$ ) em relação ao trabalho de Najafzadeh *et al.* (2010). Em nosso estudo não foi possível observar o crescimento visual do grupo controle na temperatura de 35°C após 3 ou 5 dias de incubação, porém, na temperatura de 30°C e pelo mesmo período de incubação que os trabalhos de Bedout *et al.* (1998) e Caligiorne *et al.* (1999), obtivemos um ótimo crescimento do grupo controle e reprodutibilidade dos resultados.

Os valores de CIM para o itraconazol, fluconazol e o cetoconazol obtidos neste estudo são mais próximos aos valores obtidos por Andrade *et al.* (2004), o qual também utilizou incubação a 30°C. Baseado no método de diluição do antifúngico em ágar, este trabalho demonstrou que isolados sequenciais de quatro pacientes de cromoblastomicose apresentaram valores maiores de CIM para o itraconazol do que os isolados iniciais. Uma resposta terapêutica favorável com o itraconazol não foi observada para dois pacientes deste

estudo. Andrade *et al.* (2004) afirmam que embora exista pouca correlação entre o teste de susceptibilidade *in vitro* e a resposta clínica do paciente, esta relação foi estabelecida em dois isolados sequenciais.

Os resultados de CIM para a terbinafina foram maiores do que os encontrados na literatura. Andrade *et al.* (2004) encontraram CIM para terbinafina variando de  $< 0.09 - 0.18$   $\mu\text{g/mL}$  em 14 isolados de *F. pedrosoi*. Biancalana *et al.* (2011) avaliaram 8 isolados de *F. pedrosoi* frente a terbinafina, utilizando a metodologia proposta pela norma M38-A2. A faixa de CIM para terbinafina encontrada foi de  $0.25 - 4$   $\mu\text{g/mL}$ . Recentemente, Daboit *et al.* (2013) realizaram um estudo de suscetibilidade com 44 isolados clínicos de *Fonsecaea* spp. onde a terbinafina apresentou a melhor atividade *in vitro* dentre os fármacos testados (variação de  $0.031 - 0.25$   $\mu\text{g/mL}$ ). Em relação a outras espécies de fungos causadores da cromoblastomicose, Deng *et al.* (2013) avaliaram 81 isolados de *Cladophialophora carrionii* frente à nove fármacos antifúngicos. Os resultados obtidos demonstram uma atividade da terbinafina ( $\text{CIM}_{90} = 0.125$   $\mu\text{g/mL}$ ) superior aos novos azólicos isavuconazol e voriconazol ( $\text{CIM}_{90} = 0.125$   $\mu\text{g/mL}$ ).

Nossos resultados de CIM para terbinafina variaram de  $0.125 - >16$   $\mu\text{g/mL}$ , com  $\text{CIM}_{90} = 4$   $\mu\text{g/mL}$ , indicando uma baixa atividade *in vitro* frente aos isolados clínicos deste estudo. Ressalta-se que o controle de qualidade dos testes foi realizado com as cepas *Candida parapsilosis* ATCC<sup>®</sup> 22019 e *Candida Krusei* ATCC<sup>®</sup> 6258, com os resultados de suscetibilidade compreendidos na faixa permitida pela norma M38-A2. Adicionalmente, os valores de CIM  $>16$   $\mu\text{g/mL}$  para dois isolados clínicos contribuem para o alto valor de  $\text{CIM}_{90}$ . Ferramentas de identificação molecular, baseadas em sequências ITS do DNA ribossomal podem ser aplicadas em experimentos futuros para confirmação da identidade destes dois isolados como *F. pedrosoi*, uma vez que estes apresentaram CIM  $>16$   $\mu\text{g/mL}$ .

Pode-se observar que a sensibilidade *in vitro* ao itraconazol não é acompanhada com uma terapia eficaz em todos os casos. De acordo com Vitale *et al.* (2009) uma das razões está no fato de que os testes de susceptibilidade são realizados com suspensões de conídios e não com células escleróticas. Outros fatores que podem estar associados incluem a presença de parede celular altamente melanizada e o pH no sítio de infecção, os quais poderiam limitar a penetração do fármaco antifúngico ou limitar a resposta imune do hospedeiro. Experimentos futuros que determinem a susceptibilidade de células escleróticas induzidas *in vitro* bem como

a correlação com as concentrações plasmáticas e teciduais dos fármacos utilizados no tratamento podem ajudar nesta questão.

Estudos a respeito das alterações morfológicas induzidas em conídios de *F. pedrosoi* pelo itraconazol ou terbinafina nas respectivas CIMs ou nas concentrações de 16, 32 ou 64 µg/mL não são encontrados na literatura. No entanto, alguns estudos envolvendo alterações morfológicas em outras espécies fúngicas já foram desenvolvidos. Hifas de *Aspergillus fumigatus* tratadas com itraconazol por apenas 3 horas apresentam parede celular alterada, além de deformação na mitocôndria e no núcleo (GANGWAR *et al.*, 2006). Guerra *et al.* (2012) mostraram, por meio da MET, que leveduras de *Cryptococcus neoformans* tratados com a respectiva CIM<sub>50</sub> para terbinafina geram hifas verdadeiras após 5 dias de incubação a 35°C. A formação de vacúolos citoplasmáticos em *Candida tropicalis* após exposição ao fluconazol 128 µg/mL foi documentada no trabalho de Dornellas-Ribeiro *et al.* (2012), assim como irregularidades na membrana plasmática, parede celular espessa e mitocôndria frouxa na concentração de 8 µg/mL.

Em relação a *F. pedrosoi*, Franzen *et al.* (2006) avaliaram a influência do triciclazol, um inibidor específico da síntese de DHN-melanina, na parede celular e em estrutura intracelulares de conídios. Pela microscopia eletrônica, foi observado um acúmulo de vacúolos eletrolucentes no citoplasma dos conídios bem como uma redução na espessura da parede celular após o tratamento com triciclazol 16 µg/mL.

Na CIM para o itraconazol pode-se observar um aumento no diâmetro dos conídios em relação ao grupo controle, semelhantes aos resultados de Dornellas-Ribeiro *et al.* (2012) com *Candida tropicalis* tratada com fluconazol 8 e 128 µg/mL. Essas alterações não foram observadas em conídios tratados com a CIM para a terbinafina. Da mesma forma, a formação de vacúolos, o contorno irregular da célula e o desprendimento de material da parede celular foram encontrados apenas em conídios tratados com itraconazol 16 µg/mL. Portanto, sugere-se um comportamento morfológico diferente de conídios frente ao itraconazol ou a terbinafina durante os testes de susceptibilidade *in vitro*.

A vacuolização em conídios de *F. pedrosoi* foi observada no trabalho de Palmeira *et al.* (2008) com nelfinavir e saquinavir 100 µM, inibidores de peptidase do vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV). Estes autores também encontraram invaginação

da membrana celular, além de desordem, destacamento e ruptura da parede celular. Em nosso estudo foi possível observar a ruptura da parede celular de conídios, nas concentrações de 16 e 32 µg/mL para o itraconazol. No entanto, mesmo na concentração de 64 µg/mL de itraconazol, onde a destruição celular mostrou-se mais intensa, foi possível notar a presença de conídios íntegros. Estes dados estão de acordo com o trabalho de Andrade *et al.* (2004), o qual estabelece valores de concentração letal mínima  $\geq 32$  µg/mL para alguns isolados clínicos de *F. pedrosoi*.

## 6. CONCLUSÕES

- O itraconazol, em comparação com o cetoconazol, a terbinafina e o fluconazol demonstrou melhor atividade antifúngica *in vitro* frente à conídios de *F. pedrosoi*.
- O itraconazol provocou um aumento no diâmetro celular em conídios de *F. pedrosoi* tratados com a Concentração Inibitória Mínima.
- O itraconazol induziu alterações morfológicas em conídios de *F. pedrosoi* tratados com 16, 32 e 64 µg/mL, tais como a formação de vacúolos, o contorno irregular da célula, o desprendimento de material da parede celular e o rompimento da parede celular.
- A terbinafina e o fluconazol demonstraram baixa atividade *in vitro* frente à conídios de *F. pedrosoi*.
- A terbinafina não induziu alterações morfológicas significativas em conídios de *F. pedrosoi* tratados com a Concentração Inibitória Mínima, 16, 32 e 64 µg/mL.
- 5-fluorocitosina provocou alterações ultraestruturais na concentração de 64 µg/mL em hifas e conídios de *F. pedrosoi*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABLIZ, P., FUKUSHIMA, K., TAKIZAWA, K. et al. Rapid identification of the genus *Fonsecaea* by PCR with specific oligonucleotide primers. *J.Clin.Microbiol.* v.41, p.873-876, 2003.
2. ABLIZ, P., FUKUSHIMA, K., TAKIZAWA, K. et al. Specific oligonucleotide primers for identification of *Cladophialophora carrionii*, a causative agent of chromoblastomycosis. *J.Clin.Microbiol.* v.42, p.404-407, 2004.
3. ALVIANO, C. S., FARBIARZ, S. R., TRAVASSOS, L. R. et al. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propanolol. *Mycopathologia* v.119, p.17-23, 1992.
4. ALVIANO, D. S., KNEIPP, L. F., LOPES, A. H. et al. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. *Res.Microbiol.* v.154, p.689-695, 2003.
5. AMEEN, M. Chromoblastomycosis: clinical presentation and management. *Clin.Exp.Dermatol.* v.34, p.849-854, 2009.
6. \_\_\_\_\_. Managing chromoblastomycosis. *Trop.Doct.* v.40, p.65-67, 2010.
7. ANDRADE, T. S., CASTRO, L. G., NUNES, R. S. et al. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses* v.47, p.216-221, 2004.
8. AZAD, K., KHANNA, G., CAPOOR, M. R. et al. *Cladophialophora carrionii*: an aetiological agent of cutaneous chromoblastomycosis from a non-endemic area, North India. *Mycoses* v.54, p.e217-e219, 2011.
9. AZEVEDO, C. M., MARQUES, S. G., RESENDE, M. A. et al. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of a severe case of chromoblastomycosis. *Mycoses* v.51, p.341-344, 2008.
10. BIANCALANA, F. S., LYRA, L., MORETTI, M. L. et al. Susceptibility testing of terbinafine alone and in combination with amphotericin B, itraconazole, or voriconazole against conidia and hyphae of dematiaceous molds. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* v.71, p.378-385, 2011.
11. BLYTH, C. C. Antifungal azoles: old and new. *Pediatr.Infect.Dis.J.* v.30, p.506-507, 2011.
12. BONIFAZ, A., CARRASCO-GERARD, E., SAUL, A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* v.44, p.1-7, 2001.
13. BONIFAZ, A., MARTINEZ-SOTO, E., CARRASCO-GERARD, E. et al. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery, and a combination of both. *Int.J.Dermatol.* v.36, p.542-547, 1997.

14. BONIFAZ, A., PAREDES-SOLIS, V., SAUL, A. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. *Expert.Opin.Pharmacother.* v.5, p.247-254, 2004.
15. BONIFAZ, A., SAUL, A., PAREDES-SOLIS, V. et al. Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine: experience with four cases. *J.Dermatolog.Treat.* v.16, p.47-51, 2005.
16. BONIFAZ, A., VAZQUEZ-GONZALEZ, D., PERUSQUIA-ORTIZ, A. M. Subcutaneous mycoses: chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma. *J.Dtsch.Dermatol.Ges.* v.8, p.619-627, 2010.
17. CALIGIORNE, R. B., RESENDE, M. A., MELILLO, P. H. et al. *In vitro* susceptibility of chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis agents to antifungal drugs. *Med.Mycol.* v.37, p.405-409, 1999.
18. CASTRO, L. G., PIMENTEL, E. R., LACAZ, C. S. Treatment of chromomycosis by cryosurgery with liquid nitrogen: 15 years' experience. *Int.J.Dermatol.* v.42, p.408-412, 2003.
19. CUNHA, M. M., FRANZEN, A. J., ALVIANO, D. S. et al. Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. *Microsc.Res.Tech.* v.68, p.377-384, 2005.
20. CUNHA, M. M., FRANZEN, A. J., SEABRA, S. H. et al. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC.Microbiol.* v.10, p.80, 2010.
21. DA SILVA, J. P., ALVIANO, D. S., ALVIANO, C. S. et al. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* v.33, p.63-69, 2002.
22. DA SILVA, J. P., DA SILVA, M. B., SALGADO, U. I. et al. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* v.50, p.104-111, 2007.
23. DA SILVA, M. B. Produção de novos meios de cultura para diferenciação celular de *Fonsecaea pedrosoi* e análise da influência iônica sobre o seu dimorfismo. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas. Belém: Universidade Federal do Pará, 2006., 2006.
24. DA SILVA, M. B., DA SILVA, J. P., YAMANO S.S.P. et al. Development of natural culture media for rapid induction of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells in vitro. *J.Clin.Microbiol.* v.46, p.3839-3841, 2008.
25. DABOIT, T. C., MASSOTTI, M. C., HEIDRICH, D. et al. *In vitro* susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and to the combination of terbinafine and amphotericin B. *Mycoses*, 2013.
26. DARKES, M. J., SCOTT, L. J., GOA, K. L. Terbinafine: a review of its use in onychomycosis in adults. *Am.J.Clin.Dermatol.* v.4, p.39-65, 2003.

27. DE BEDOUT, C., GOMEZ, B. L., RESTREPO, A. In vitro susceptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* v.39, p.145-148, 1997.
28. DE BEULE, K. Itraconazole: pharmacology, clinical experience and future development. *Int.J.Antimicrob.Agents* v.6, p.175-181, 1996.
29. DE HOOG, G. S., ATTILI-ANGELIS, D., VICENTE, V. A. et al. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. *Med.Mycol.* v.42, p.405-416, 2004.
30. DIXON, D. M. & WALSH, T. J. Antifungal Agents., 1996.
31. DORNELAS-RIBEIRO, M., PINHEIRO, E. O., GUERRA, C. et al. Cellular characterisation of *Candida tropicalis* presenting fluconazole-related trailing growth. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* v.107, p.31-38, 2012.
32. ESTERRE, P., ANDRIANTSIMAHAVANDY, A., RAMARCEL, E. R. et al. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* v.55, p.45-47, 1996a.
33. ESTERRE, P., INZAN, C. K., RAMARCEL, E. R. et al. Treatment of chromomycosis with terbinafine: preliminary results of an open pilot study. *Br.J.Dermatol.* v.134 Suppl 46, p.33-36, 1996b.
34. FOTHERGILL, A. W., RINALDI, M. G., SUTTON, D. A. Antifungal susceptibility testing of *Exophiala* spp.: a head-to-head comparison of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *Med.Mycol.* v.47, p.41-43, 2009.
35. FRANZEN, A. J., CUNHA, M. M., BATISTA, E. J. et al. 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. *Microsc.Res.Tech.* v.69, p.729-737, 2006.
36. FRANZEN, A. J., CUNHA, M. M., MIRANDA, K. et al. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *J.Struct.Biol.* v.162, p.75-84, 2008.
37. GANGWAR, M., COLE, R., RAMANI, R. et al. Application of fluorescent probes to study structural changes in *Aspergillus fumigatus* exposed to amphotericin B, itraconazole, and voriconazole. *Mycopathologia* v.162, p.103-109, 2006.
38. GARNICA, M., NUCCI, M., QUEIROZ-TELLES, F. Difficult mycoses of the skin: advances in the epidemiology and management of eumycetoma, phaeohyphomycosis and chromoblastomycosis. *Curr.Opin.Infect.Dis.* v.22, p.559-563, 2009.
39. GEZUELE, E., MACKINNON, J. E., CONTI-DIAZ, I. A. The frequent isolation of *Phialophora verrucosa* and *Phialophora pedrosoi* from natural sources. *Sabouraudia.* v.10, p.266-273, 1972.
40. GHANNOUM, M. A. & RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin.Microbiol.Rev.* v.12, p.501-517, 1999.

41. GOMES, M. H. R. & RESENDE, M. A. *Fonsecaea pedrosoi*: lipid composition and determination of susceptibility to amphotericin B. *Canadian Journal of Microbiology* v.38, p.209-214, 1992.
42. GUERRA, C. R., ISHIDA, K., NUCCI, M. et al. Terbinafine inhibits *Cryptococcus neoformans* growth and modulates fungal morphology. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* v.107, p.582-590, 2012.
43. 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. *Med.Mycol.* v.40, p.529-534, 2002.
44. IBRAHIM-GRANET, O., GUÉHO, E., DE BIÈVRE, C. Induction of yeast-like cells in a strain of *Fonsecaea pedrosoi* cultured under very acid conditions. *Mycopathologia* v.90, p.35-39, 1985.
45. KIM, D. M., HWANG, S. M., SUH, M. K. et al. Chromoblastomycosis Caused by *Fonsecaea pedrosoi*. *Ann.Dermatol.* v.23, p.369-374, 2011.
46. LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J. E. C. et al. In: Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. Provas de sensibilidade *in vitro*, dosagem sanguínea. Ed. Sarvier: São Paulo, p.998-1061, 2002a.
47. \_\_\_\_\_. In:Cromoblastomicose. Tratado de Micologia Médica. Ed.Sarvier: São Paulo, p.441-461, 2002b.
48. LIANG, H. Sordarin, an antifungal agent with a unique mode of action. *Beilstein.J.Org.Chem.* v.4, p.31, 2008.
49. LOPEZ, M. R. & MENDEZ TOVAR, L. J. Chromoblastomycosis. *Clin.Dermatol.* v.25, p.188-194, 2007.
50. LUPI, O., TYRING, S. K., MCGINNIS, M. R. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. *J.Am.Acad.Dermatol.* v.53, p.931-51, quiz, 2005.
51. LYON, J. P., DE MARIA PEDROSO E SILVA AZEVEDO, MOREIRA, L. M. et al. Photodynamic antifungal therapy against chromoblastomycosis. *Mycopathologia* v.172, p.293-297, 2011.
52. MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. *Clin.Microbiol.Infect.* v.10 Suppl 1, p.1-10, 2004.
53. MARQUES, S. G., PEDROZO SILVA, C. M., RESENDE, M. A. et al. Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella aquaspersa*. *Med.Mycol.* v.42, p.261-265, 2004.
54. MARQUES, S. G., SILVA, C. M., SALDANHA, P. C. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhao Brazil. *Nihon Ishinkin.Gakkai Zasshi* v.47, p.305-311, 2006.

55. MCGINNIS, M. R. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. *J.Am.Acad.Dermatol.* v.8, p.1-16, 1983.
56. MCGINNIS, M. R. & PASARELL, L. In vitro testing of susceptibilities of filamentous ascomycetes to voriconazole, itraconazole, and amphotericin B, with consideration of phylogenetic implications. *J.Clin.Microbiol.* v.36, p.2353-2355, 1998.
57. MENDOZA, L., KARUPPAYIL, S. M., SZANISZLO, P. J. Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi. *Mycoses* v.36, p.157-164, 1993.
58. MOUCHALOUAT, M. F., GUTIERREZ GALHARDO, M. C., ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. et al. Chromoblastomycosis: a clinical and molecular study of 18 cases in Rio de Janeiro, Brazil. *Int.J.Dermatol.* v.50, p.981-986, 2011.
59. NAJAFZADEH, M. J., BADALI, H., ILLNAIT-ZARAGOZI, M. T. et al. In vitro activities of eight antifungal drugs against 55 clinical isolates of *Fonsecaea* spp. *Antimicrob.Agents Chemother.* v.54, p.1636-1638, 2010a.
60. NAJAFZADEH, M. J., SUN, J., VICENTE, V. et al. *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. *Med.Mycol.* v.48, p.800-806, 2010b.
61. NAJAFZADEH, M. J., SUN, J., VICENTE, V. A. et al. Rapid identification of fungal pathogens by rolling circle amplification using *Fonsecaea* as a model. *Mycoses* v.54, p.e577-e582, 2011a.
62. NAJAFZADEH, M. J., SUN, J., VICENTE, V. A. et al. Molecular epidemiology of *Fonsecaea* species. *Emerg.Infect.Dis.* v.17, p.464-469, 2011b.
63. NAJAFZADEH, M. J., VICENTE, V. A., SUN, J. et al. *Fonsecaea multimorphosa* sp. nov, a new species of Chaetothyriales isolated from a feline cerebral abscess. *Fungal.Biol.* v.115, p.1066-1076, 2011c.
64. PARK, S. G., OH, S. H., SUH, S. B. et al. A case of chromoblastomycosis with an unusual clinical manifestation caused by *Phialophora verrucosa* on an unexposed area: treatment with a combination of amphotericin B and 5-flucytosine. *Br.J.Dermatol.* v.152, p.560-564, 2005.
65. PEREIRA, S. S. M. Análise da interação *in vitro* entre *Fonsecaea pedrosoi* e macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 e BALB/c. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas. Belém: Universidade Federal do Pará, 2008.
66. PIERARD, G. E., ARRESE, J. E., PIERARD-FRANCHIMONT, C. Itraconazole. *Expert.Opin.Pharmacother.* v.1, p.287-304, 2000.
67. POIRRIEZ, J., BREUILLARD, F., FRANCOIS, N. et al. A case of chromomycosis treated by a combination of cryotherapy, shaving, oral 5-fluorocytosine, and oral amphotericin B. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* v.63, p.61-63, 2000.

68. QUEIROZ-TELLES, F., ESTERRE, P., PEREZ-BLANCO, M. et al. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med.Mycol.* v.47, p.3-15, 2009.
69. QUEIROZ-TELLES, F., MCGINNIS, M. R., SALKIN, I. et al. Subcutaneous mycoses. *Infect.Dis.Clin.North Am.* v.17, p.59-85, viii, 2003.
70. QUEIROZ-TELLES, F., NUCCI, M., COLOMBO, A. L. et al. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med.Mycol.* v.49, p.225-236, 2011.
71. QUEIROZ-TELLES, F., PURIM, K. S., FILLUS, J. N. et al. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. *Int.J.Dermatol.* v.31, p.805-812, 1992.
72. QUEIROZ-TELLES, F. & SANTOS, D. W. Challenges in the therapy of chromoblastomycosis. *Mycopathologia* v.175, p.477-488, 2013.
73. REVANKAR, S. G. & SUTTON, D. A. Melanized fungi in human disease. *Clin.Microbiol.Rev.* v.23, p.884-928, 2010.
74. RUBIN, H. A., BRUCE, S., ROSEN, T. et al. Evidence for percutaneous inoculation as the mode of transmission for chromoblastomycosis. *J.Am.Acad.Dermatol.* v.25, p.951-954, 1991.
75. SALGADO, C. G. Fungal x host interactions in Chromoblastomycosis: what we have learned from animal models and what is yet to be solved. *Virulence.* v.1, p.3-5, 2010.
76. SALGADO, C. G., DA SILVA, J. P., DA SILVA, M. B. et al. Cutaneous diffuse chromoblastomycosis. *Lancet Infect.Dis.* v.5, p.528, 2005.
77. SALGADO, C. G., DA SILVA, J. P., DINIZ, J. A. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* v.46, p.33-36, 2004.
78. SALGADO, C. G., DA SILVA, M. B., YAMANO, S. S. et al. Cutaneous localized annular chromoblastomycosis. *J.Cutan.Pathol.* v.36, p.257-261, 2009.
79. SANTOS, A. L., PALMEIRA, V. F., ROZENTAL, S. et al. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiol.Rev.* v.31, p.570-591, 2007.
80. SHEEHAN, D. J., HITCHCOCK, C. A., SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin.Microbiol.Rev.* v.12, p.40-79, 1999.
81. SILVA, J. P., DE SOUZA, W., ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia* v.143, p.171-175, 1998.
82. SMITH, C. H., BARKER, J. N., HAY, R. J. A case of chromoblastomycosis responding to treatment with itraconazole. *Br.J.Dermatol.* v.128, p.436-439, 1993.

83. SOARES, R. M. A., ANGLUSTER, J., DE SOUZA, W. et al. Carbohydrate and lipid components of hyphae and conidia of human pathogen *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycopathologia* v.132, p.71-77, 1995.
84. SON, Y. M., KANG, H. K., NA, S. Y. et al. Chromoblastomycosis Caused by *Phialophora richardsiae*. *Ann.Dermatol.* v.22, p.362-366, 2010.
85. SUN, J., NAJAFZADEH, M. J., VICENTE, V. et al. Rapid detection of pathogenic fungi using loop-mediated isothermal amplification, exemplified by *Fonsecaea* agents of chromoblastomycosis. *J.Microbiol.Methods* v.80, p.19-24, 2010.
86. TOMSON, N., ABDULLAH, A., MAHESHWARI, M. B. Chromomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *Clin.Exp.Dermatol.* v.31, p.239-241, 2006.
87. TORRES-GUERRERO, E., ISA-ISA, R., ISA, M. et al. Chromoblastomycosis. *Clin.Dermatol.* v.30, p.403-408, 2012.
88. UNGPAKORN, R. & REANGCHAINAM, S. Pulse itraconazole 400 mg daily in the treatment of chromoblastomycosis. *Clin.Exp.Dermatol.* v.31, p.245-247, 2006.
89. VERMES, A., VAN DER, S. H., GUCHELAAR, H. J. Flucytosine: correlation between toxicity and pharmacokinetic parameters. *Chemotherapy* v.46, p.86-94, 2000b.
90. \_\_\_\_\_. Flucytosine: correlation between toxicity and pharmacokinetic parameters. *Chemotherapy* v.46, p.86-94, 2000a.
91. VITALE, R. G., DE HOOG, G. S., VERWEIJ, P. E. In vitro activity of amphotericin B, itraconazole, terbinafine and 5-fluocytosine against *Exophiala spinifera* and evaluation of post-antifungal effects. *Med.Mycol.* v.41, p.301-307, 2003.
92. VITALE, R. G., PEREZ-BLANCO, M., DE HOOG, G. S. In vitro activity of antifungal drugs against *Cladophialophora* species associated with human chromoblastomycosis. *Med.Mycol.* v.47, p.35-40, 2009.
93. ZEPPENFELDT, G. F., RICHARD-YEGRES, N., YEGRES, F. *Cladosporium carrionii*: hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomycosis en Venezuela. *Rev.Iberoam.Micol.* v.11, p.61-63, 1994.