



Serviço Público Federal
Universidade Federal do Pará - UFPA
Instituto de Ciências Biológicas - ICB

Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de *Fonsecaea* spp a diferentes antifúngicos e análise das concentrações plasmáticas de itraconazol e hidroxitraconazol em pacientes com cromoblastomicose na região amazônica

Daniella Paternostro de Araújo

Belém- Pará
2015



Serviço Público Federal
Universidade Federal do Pará - UFPA
Instituto de Ciências Biológicas - ICB

Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de *Fonsecaea* spp a diferentes antifúngicos e análise das concentrações plasmáticas de itraconazol e hidroxitraconazol em pacientes com cromoblastomicose na região amazônica

Daniella Paternostro de Araújo

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de doutor em Neurociência e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Guedes Salgado
Instituto de Ciências Biológicas - ICB
Universidade Federal do Pará - UFPA

Belém- Pará
2015



Serviço Público Federal
Universidade Federal do Pará - UFPA
Instituto de Ciências Biológicas - ICB

Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de *Fonsecaea* spp a diferentes antifúngicos e análise das concentrações plasmáticas de itraconazol e hidroxitraconazol em pacientes com cromoblastomicose na região amazônica

Daniella Paternostro de Araújo

Banca Examinadora:

Presidente da banca: Prof. Dr. Cláudio Guedes Salgado

Prof. Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho
Instituição UFPR

Prof. Dr. Jorge Pereira da Silva
Instituição UFPA

Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Jr
Instituição UFPA

Belém- Pará
2015

A Meu Pai João Anselmo de Araújo (in memória)
A minha mãe Maria Filomena Paternostro de Araújo

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará pela oportunidade no desenvolvimento da minha carreira científica, e especialmente aos Laboratórios de Dermato-Imunologia e Toxicologia, onde foram planejados e executados todos os experimentos do presente estudo.

À Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular e seus professores que participaram direta ou indiretamente no meu aprendizado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cláudio Guedes Salgado, por me apresentar a cromoblastomicose e permitir a realização deste estudo. Além de todo o apoio, compreensão e confiança.

Aos Professores Dr. José Luiz Vieira, Moises Batista da Silva e Josafá Barreto pelo apoio, paciência e aprendizado durante os últimos anos. E com certeza, foi uma convivência produtiva, de grande evolução profissional.

A Prof. Dra. Vânia Aparecida Vicente e a todos do laboratório de microbiologia molecular da UFPR (Universidade Federal do Paraná), pelo apoio dado a este trabalho nas identificações dos agentes causadores da cromoblastomicose.

Aos colegas do Laboratório de Dermato-imunologia: Heleno, Simone, Tânia, Patrícia, Suellen, Raquel e Angélica. Aos colaboradores, Érica, Marcos, André, Silvia, Giselle e Raimundinho pelo carinho e agradáveis momentos de descontração que vivemos.

A minha vovó Maria Josefina Mileo Paternostro, por todo apoio e carinho ao longo desses anos, pois sem você jamais teria conseguido.

As minhas tias queridas e amadas Domingas, Cacá, Angélica, Lívia Paternostro. Agradeço especialmente (Tia Angélica e Tia Lívia) por terem me acolhido em suas casas com todo amor, carinho e paciência contribuindo para minha formação pessoal e profissional.

A minha Mãe Maria Filomena Paternostro e ao meu Pai Anselmo (in memória), principais responsáveis por minhas conquistas.

Aos meus irmãos que tanto amo, Giovanni, Gianluca e Deborah pelo apoio, incentivo e carinho. Agradeço especialmente a Deborah e Vanessa por ter me ajudado com a Lívia para que pudesse desenvolver este trabalho.

Ao meu esposo e maior incentivador Alan Grisólia, por estar comigo em todos os momentos, me apoiando e orientando nas escolhas corretas da minha vida. Obrigado por ouvir meus desabafos, me aconselhar, por estar sempre tão presente e me dar apoio e carinho.

A minha pequerrucha Lívia Grisólia, quem me apresentou o amor incondicional.

Aos órgãos de fomento, CAPES, PROAMAZÔNIA, FAPESPA, CNPQ, PPSUS e FADESP pelo auxílio financeiro.

A todos, meu muito obrigado.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”

Carl Sagan

RESUMO

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose por implantação fúngica na pele, de evolução crônica, causada pela inoculação traumática de fungos dematiáceos. O Estado do Pará é uma das principais áreas endêmicas, sendo *F. pedrosoi* o principal agente etiológico. A baixa taxa de cura é reflexo da falta de um esquema terapêutico padronizado e da escassez de dados relacionados a suscetibilidade de fungos negros aos fármacos disponíveis para o tratamento. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *Fonsecaea spp.* frente a nove antifúngicos, correlacionando as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) do itraconazol (ITZ) com a evolução clínica e os tipos de lesões, além de quantificar os níveis plasmáticos de ITZ e Hidroxi-ITZ (ITZOH) em pacientes atendidos na Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária do Estado do Pará Dr. Marcello Candia. Os 38 isolados clínicos de *Fonsecaea* foram avaliados em relação ao ITZ, cetoconazol (CTZ), posaconazol (PCZ), voriconazol (VCZ), fluconazol (FCZ), anfotericina B (ANF B), caspofungina (CAS), terbinafina (TBF) e 5-fluorocitosina (5-FLU), de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, documento M38-A2). A CIM para cada fármaco utilizado foi obtida após 5 dias de incubação a 30°C, e dentre os fármacos testados, o PCZ foi o mais efetivo (CIM 0.28 µg/ml, CFM 4.35 µg/ml) podendo ser uma alternativa terapêutica em isolados não sensíveis ao ITZ. Os resultados da correlação entre a CIM do ITZ e a evolução clínica demonstraram que os pacientes com piora tiveram um valor médio ± erro padrão da média (0.90 ± 0.10 µg/ml) superior aos sem melhora (0.45 ± 0.05 µg/ml) com melhora (0.59 ± 0.05 µg/ml) e cura (0.45 ± 0.05 µg/ml), com diferença significativa (p < 0.05) entre os grupos. Não houve correlação entre o CIM do ITZ e os tipos de lesões dos pacientes. Observamos uma grande variabilidade interindividual entre os níveis plasmáticos de ITZ e ITZOH, sendo importante destacar que o ITZOH estava até 3 vezes mais elevado no plasma dos pacientes (p < 0.001), o que pode contribuir para atividade antifúngica do tratamento e sugere uma importante contribuição deste metabólito na terapia. Por fim, avaliamos três pacientes que foram submetidos a altas doses de ITZ, 600 mg/dia, com aumento significativo dos níveis plasmáticos de ITZOH (p=0.0148) e uma concentração >1000 ng/ml na somatória ITZ+ITZOH, considerada satisfatória para a maioria das infecções fúngicas, além de apresentarem melhora do quadro clínico. Em resumo, nossos dados 1) confirmam *F. pedrosoi* como o principal agente etiológico da CBM no Pará; 2) não evidenciam correlação entre as lesões, as espécies e a sensibilidade ao ITZ; 3) demonstram que ITZ, VCZ e PCZ foram os fármacos com menor CIM, sendo que o PCZ apresentou a menor CFM; 4) correlacionam o metabólito ITZOH com a evolução clínica dos pacientes e; 5) indicam que o uso de altas doses de até 600 mg/dia de ITZ podem ser usadas em pacientes que não respondem a doses terapêuticas menores.

Palavras-Chave: Cromoblastomicose, *Fonsecaea spp.*, Suscetibilidade Antifúngica, Itraconazol.

ABSTRACT

Chromoblastomycosis (CBM) is a fungal infection by implantation in the skin, with a chronic evolution, caused by traumatic inoculation of dematiaceous fungi. Pará state is one of the most important endemic areas in Brazil, and *F. pedrosoi* is the most prevalent agent. The low cure rate is consequence of the lack of a standardized treatment regimen and there are a few works related to susceptibility of black fungi to the drugs available for treatment. The main objective of this study was to evaluate *in vitro* susceptibility of clinical isolates of *Fonsecaea* spp. against nine antifungals, correlating itraconazole (ITZ) minimal inhibitory concentrations (MIC) and minimal fungicidal concentrations (MFC) with clinical outcome and the types of lesions. Furthermore, plasma levels of ITZ and ITZOH were measured in patients treated in Dr Marcello Candia Reference Unit in Sanitary Dermatology (UREMC, Pará State). Thirty-eight clinical isolates of *Fonsecaea* spp. were evaluated against ITZ, ketoconazole (CTZ), posaconazole (PCZ), voriconazole (VCZ), fluconazole (FCZ), amphotericin B (ANF B), caspofungin (CAS), terbinafine (TBF) and 5-fluorocytosine (5-FLU), according to the protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M38-A2 document). After 5 days of incubation at 30°C, MICs were determined visually evaluating fungal growth in different drug concentrations, in comparison to the drug-free control wells. PCZ was the most effective (MIC 0.28 µg/ml, MFC 4.35 µg/ml) drug. The correlation between the MIC to ITZ and clinical outcome results demonstrate that patients with worsening had a media value \pm SEM (0.90 ± 0.10 µg/ml) superior to no improvement (0.45 ± 0.05 µg/ml) or improvement (0.59 ± 0.05 µg/ml) and cure (0.45 ± 0.05 µg/ml), with a significant difference ($p < 0.05$) among the groups. There was no correlation between ITZ CIM and types of lesions. We observed a large inter-individual variability of ITZ and ITZOH plasma levels. ITZOH was up to 3 times higher in the plasma of patients ($p < 0.001$), which can contribute to the antifungal treatment and suggests an important participation of this metabolite in therapy. Lastly, we evaluated three patients who underwent high dose 600 mg/day ITZ with a significant increase of ITZOH ($p= 0.0148$) plasma levels. In summary, our data 1) confirmed *F. pedrosoi* as the main agent of CBM in Pará; 2) did not show correlation between the lesions, species and ITZ sensitivity; 3) Showed that ITZ, VCZ and PCZ are the drugs with lower CIM, wherein PCZ had the lowest MFC; 4) correlated the metabolite ITZOH with the clinical evolution of patients and; 5) indicated that the use of high doses of up to 600 mg/day ITZ can be used in patients who do not respond to lower therapeutic doses.

Keywords: Chromoblastomycosis, *Fonsecaea* spp, Antifungal Susceptibility, Itraconazole.

SUMÁRIO

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 CROMOBLASTOMICOSE: CONSIDERAÇÕES INICIAIS	14
1.2 EPIDEMIOLOGIA	15
1.3 AGENTES ETIOLÓGICOS	19
1.4 HABITAT	22
1.5 ASPECTO CLÍNICO	23
1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	24
1.7 TRATAMENTO DA CROMOBLASTOMICOSE	25
1.8 TESTE DE SENSIBILIDADE <i>in vitro</i> A AGENTES ANTIFÚNGICOS	27
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	33
4.2 PACIENTE COM CROMOBLASTOMICOSE	33
4.3 PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS FÚNGICAS	34
4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	34
4.4.1 OBTENÇÃO DA CULTURA MONOSPÓRICA	35
4.4.2 EXTRAÇÃO DO DNA E PACIENTE COM CROMOBLASTOMICOSE	35
4.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE <i>in vitro</i> ANTIFÚNGICOS	37
4.5.1 PREPARAÇÃO E DILUIÇÕES DOS ANTIFÚNGICOS	37
4.5.2 PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS	38
4.5.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	38
4.5.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA	39
4.6 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE ITZ E ITZOH.	41
4.6.1 ANÁLISE CROMATOGRÁTICA	41
4.6.2 SOLUÇÕES PADRÃO E CURVA DE CALIBRAÇÃO	42
4.6.3 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE ITZ E ITZOH DO PLASMA	42
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5. RESULTADOS	44
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÃO	81
8. REFERÊNCIAS	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características epidemiológicas dos 38 pacientes com CBM atendidos na URE Marcello Candia	45
Tabela 2: Distribuição epidemiológica de acordo com idade, sexo e ocupação dos com CBM	46
Tabela 3: Distribuição geográfica dos pacientes com CBM atendidos na URE Marcello Candia	47
Tabela 4: Região anatômica dos pacientes com CBM atendidos na URE Marcello Candia	47
Tabela 5: Tipo de lesões dos pacientes com CBM atendidos na URE Marcello Candia	47
Tabela 6: Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Fonsecaea</i> spp em relação a nove agentes antifúngicos	49
Tabela 7: Avaliação da Concentração Fungicida Mínima dos 38 isolados clínicos de <i>Fonsecaea</i> spp	53
Tabela 8: Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> dos 22 isolados clínicos de <i>Fonsecaea pedrosoi</i> e <i>monophora</i> em relação a nove agentes antifúngicos	55
Tabela 9: Características epidemiológicas dos três pacientes com CBM	63
Tabela 10: Análise da função hepática e renal dos três pacientes com CBM que fizeram uso de 600 mg/dia	65
Tabela 11: Características dos três pacientes com resposta clínica positiva após o início do tratamento com 600 mg/dia	66
Tabela 12: Avaliação da Concentração Inibitória Mínima dos seis isolados clínicos de <i>F.pedrosoi</i> .	66
Tabela 13: Avaliação da Concentração Fungicida Mínima dos seis isolados clínicos de <i>F.pedrosoi</i> .	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial dos casos publicados de cromoblastomicose	17
Figura 2: Distribuição nacional dos casos publicados de cromoblastomicose	19
Figura 3: Aspectos Morfológicos <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	22
Figura 4: Classificação da cromoblastomicose de acordo com o aspecto das lesões	24
Figura 5: Distribuição dos antifúngicos diluídos nas microplacas	40
Figura 6: Perfil de suscetibilidade de 38 isolados clínicos de <i>Fonsecaea</i> spp em relação a nove antifúngicos de acordo com CIM	50
Figura 7: Perfil de suscetibilidade de 38 isolados clínicos de <i>Fonsecaea</i> spp em relação a três antifúngicos de acordo com CIM	51
Figura 8: Perfil de suscetibilidade de 38 isolados clínicos de <i>Fonsecaea</i> spp em relação a ITZ, VCZ e PCZ de acordo com CFM	54
Figura 9: Relação entre a CIM e a evolução clínica	59
Figura 10: Evolução Clínica dos pacientes com CBM	57
Figura 11: Relação entre a CIM do ITZ e as formas clínicas	58
Figura 12: Concentrações plasmáticas de ITZ nos pacientes com CBM fazendo uso de 200 mg/dia	59
Figura 13: Concentrações plasmáticas de ITZOH nos pacientes com CBM fazendo uso de 200 mg/dia	59
Figura 14: Somatória das concentrações plasmáticas de ITZ+ITZOH nos pacientes com CBM fazendo uso de 200 mg/dia	60
Figura 15: Diferença entre os níveis plasmáticos de ITZ e ITZOH em 15 amostras de pacientes com CBM	60
Figura 16: Relação entre as concentrações plasmáticas de ITZ e a evolução clínica.	61
Figura 17: Relação entre as concentrações plasmáticas de ITZOH e a evolução clínica	62
Figura 18: Evolução clínica do paciente C submetidos á altas doses de ITZ	64
Figura 19: Concentrações plasmáticas de ITZ e de ITZOH antes e após o uso de 600 mg/dia	68
Figura 20: Somatória das concentrações de ITZ + ITZOH para os três pacientes submetidos a mudança no esquema terapêutico para 600 mg/dia	69
Figura 21: Níveis plasmáticos de ITZ em pacientes com CBM antes e após o aumento da dose para 600 mg/dia	70
Figura 22: Níveis plasmáticos de ITZOH em pacientes com CBM antes e após o aumento da dose para 600 mg/dia	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ANF-	Anfotericina B
ATCC-	American Type Culture Collection
CBM-	Cromoblastomicose
CLSI-	Clinical and Laboratory Standards Institute
CAS-	Caspofungina
CIM-	Concentração Inibitória Mínima
CFM-	Concentração Fungicida Mínima
CIM ₅₀ -	Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 50%
CIM ₉₀ -	Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 90%
CFM ₅₀ -	Concentração Fungicida Mínima capaz de matar 50%
CFM ₉₀ -	Concentração Fungicida Mínima capaz de matar 90%
CC-	Controle de crescimento
CE-	Controle de Esterilidade
CTZ-	Cetoconazol.
DMSO-	Dimetilsulfóxido
DO-	Densidade Óptica
DV-	Desvio padrão
EPM-	Erro Padrão da Média
5-FLU	Fluorocitosina
FCZ-	Fluconazol
ITZ-	Itraconazol
MOPS-	Morfolinopropanosulfônico
NCCLS-	National Committee for Clinical Laboratory Standards
Nd-	Não determinado
PCZ-	Posazonazol
TBF-	Terbinafina
VCZ-	Voriconazol

1. INTRODUÇÃO

1.1. CROMOBLASTOMICOSE

A cromoblastomicose (CBM) é uma infecção fúngica crônica, definida como uma micose por implantação na pele, causada pela inoculação traumática de fungos dematiáceos ou melanizados, pertencentes à família *Herpotrichiellaceae* (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011). Os membros desta família são caracterizados por apresentarem coloração variável de verde escuro à marrom e negro devido à presença de melanina na parede celular. Essas, por sua vez, são importantes por estarem associadas com ação fotoprotetora, que permite ao fungo se desenvolver nos ambientes ensolarados, e também atua como fator de virulência reduzindo a suscetibilidade fúngica aos mecanismos de defesa do hospedeiro (RIVITTI & AOKI, 1999; NOSANCHUCK & CASADEVALL, 2003).

Em 1911, o primeiro caso de CBM foi observado pelo pesquisador brasileiro Alexandrino Pedroso, porém publicado somente em 1920 (PEDROSO & GOMES, 1920). Em 1914, o médico alemão Max Rudolph descreveu seis casos de dermatite verrucosa, conhecida pelo nome de "figueira" no estado de Minas Gerais. Contudo, não relatou a presença de células escleróticas ao exame micológico direto (RUDOLPH, 1914).

No ano seguinte, Lane e Medlar publicaram as primeiras observações clínicas da doença com isolamento de fungos pigmentados. Em 1922, Terra e colaboradores definiram a doença como uma dermatite verrucosa causada por fungos pigmentados e estabeleceram o nome de "cromoblastomicose". Esta doença também é conhecida como: dermatite verrucosa, formigueiro, doença de Pedroso, doença de Fonseca e

Gomes, micose de carrión, micose de Lane-Pedroso, blastomicose negra, cromomicose e pé-musgoso (MC GINNIS, 1983).

A CBM é considerada uma doença ocupacional, ocorrendo em trabalhadores rurais, madeireiros ou vendedores de produtos agrícolas, que não utilizam equipamentos de proteção individual (EPIs) quando manuseiam o solo e a vegetação, causando importante impacto na saúde pública em países da América Latina, onde são muitas vezes negligenciados (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011). Esta doença pode afetar qualquer idade, mas raramente ocorre antes da idade adulta e predomina em homens de 30 a 50 anos, o que se justifica pelo fato de que os traumatismos que propiciam a implantação transcutânea do fungo resultam das atividades rurais, as quais são exercidas principalmente pelos homens (LOPEZ & MENDEZ TOVAR, 2007).

1.2. EPIDEMIOLOGIA

A CBM é uma doença de distribuição mundial (**Figura 1**), descrita nas Américas, Europa, Ásia, Oceania e África, com maior frequência em regiões tropicais e subtropicais. Os países com maior prevalência são Madagascar, África do Sul, Brasil e Costa Rica (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011, BURSTEIN, 2004).

Na Europa, foram relatados casos de CBM em diversos países, como na França (LE GALL *et al.*, 1993), Rússia (MALKINA & DARCHENKOVA, 1977) e Finlândia (SONCK, 1959). Na Ásia, foram documentados mais de 500 casos de CBM na China, e os agentes etiológicos predominantes são *Cladophialophora carrionii* no norte e *F. pedrosoi* no Sul (Xi *et al.*, 2009), além de Filipinas (AL DOORY, 1972), Malásia (JAYALAKSHIMI *et al.*, 1990), Índia (RAJENDRAN *et al.*, 1997), Sri Lanka (ATTAPATTU, 1997) e Japão.

No Japão, desde 1955 o número de casos tem aumentado anualmente, e até 1983 foram observados 290 casos com isolamento de 275 cepas. O agente etiológico em 215 casos (86%) foi *F. pedrosoi*, e ao contrário de outras regiões mundiais, em mais de 50% dos casos as lesões eram localizadas na extremidade superior do corpo, na face e no pescoço (FUKUSHIRO, 1983). Uma revisão de casos no Japão destacou um adicional de 212 casos até o ano de 2001 (KONDO *et al.*, 2005). Na Oceania, um pequeno número de casos foi registrado na Austrália, sendo que na maioria dos casos relatados o principal agente etiológico é *C. carrionii* (LESLIE & BEARDMORE, 1979).

No Continente Africano, a CBM foi relatada no Quênia, Tanzânia (AL DOORY, 1972), Zaire (BANKS, 1985), Líbia (BHAKTAVIZIAM *et al.*, 1983) e Moçambique (MAGALHÃES & MEYER, 1970). Em Madagascar, o principal local de ocorrência da CBM no mundo, foram registrados 1.343 casos no período de 1955 a 1994. A maioria dos pacientes era do sexo masculino, trabalhadores rurais e lenhadores, com lesões localizadas nos membros inferiores (ESTERRE *et al.*, 1996).

Na América do norte foram descritos casos nos Estados Unidos, México e Canadá (LOPEZ & MENDEZ TOVAR, 2007, BERGER *et al.*, 1945), e na América central foram registrados casos em El Salvador (RAMIREZ, 1956), Panamá (CALERO, 1948) e Cuba (MACOLA *et al.*, 1984). Na América do Sul foram identificados casos na Venezuela (YEGRES, 1985), Colômbia (VELÁSQUEZ *et al.*, 1976), Guiana Francesa (PRADINAUD, 1974), Chile (ODDÓ & LOBOS, 1988), Uruguai (VIGNALE *et al.*, 1955) e Brasil (SILVA *et al.*, 1999).

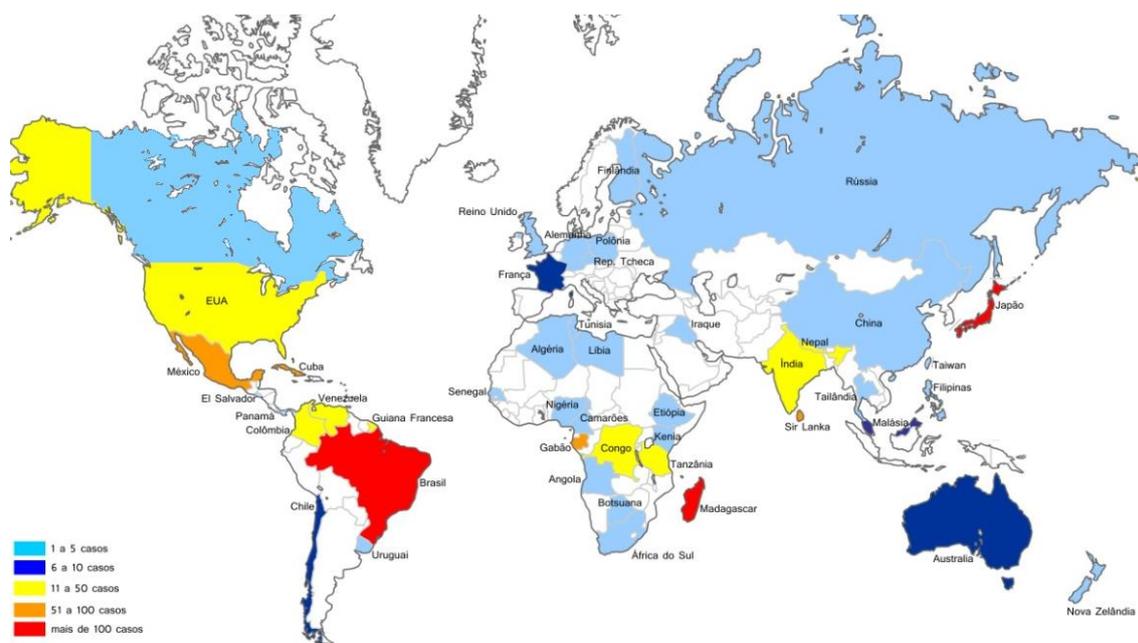


Figura 1: Distribuição mundial dos casos de cromoblastomicose.

Fonte: SALGADO, C. G. CROMOBLASTOMICOSE. In: LEÃO, RNQ. (Org.). Medicina Tropical e Infectologia na Amazônia. 1. ed. Belém: Samauma editorial, 2013.

No Brasil, mais de 500 casos de CBM já foram documentados na literatura. No entanto, acredita-se que existam mais casos desta doença, uma vez que não é uma doença de notificação compulsória (MOUCHALOUAT *et al.*, 2011). A CBM ocorre em vários estados, com casos distribuídos em todas as regiões (**Figura 2**). Estudos realizados no Maranhão, Rio Grande do Sul e na Amazônia mostram que estas áreas podem ser consideradas endêmicas da doença (MARQUES *et al.*, 2006; MINOTTO *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 1999).

A Amazônia é considerada a principal área de ocorrência da doença, pois as condições climáticas, incluindo precipitação anual média de 1500-1700 mm³, temperatura média de 28°C e umidade anual relativa de aproximadamente 83% parecem contribuir, decisivamente, para o crescimento do fungo em condições ambientais (MARQUES *et al.*, 2006).

O Estado do Maranhão ocupa o terceiro lugar no registro da doença no Brasil e a maioria dos casos ocorre na região amazônica deste estado denominada “baixada maranhense”. Recentemente, dois casos de CBM causados por *F. pedrosoi* foram relatados neste estado, com lesões situadas na região glútea, provavelmente associadas a quebra do coco babaçu (*Orbignya phalerata*), importante atividade ocupacional dos moradores desta região. Os autores chamam atenção para a possibilidade de ocorrer infecção durante a extração deste produto (MARQUES *et al.*, 2006).

No Rio Grande do Sul, Minotto e colaboradores em 2001, revisaram 100 casos de pacientes entre 1963 e 1998. Os resultados obtidos demonstraram predominância da doença entre lavradores do sexo masculino, apresentando lesões nos membros inferiores. A maioria dos casos foi encontrada na região norte do estado.

Matte e colaboradores em 1997 associaram a presença do fungo no Rio Grande do Sul aos fatores climáticos, revestimento e composição do solo, os quais favoreceriam a proliferação dos fungos. Os autores destacam ainda que nesta região predomina a pequena propriedade rural de cunho familiar, sendo habitual que o agricultor desenvolva suas atividades com as barras das calças arregaçadas e sem calçado. O tempo médio entre o aparecimento da doença e o diagnóstico médico foi de 14 anos e *F. pedrosoi* foi encontrado em 96% dos casos.

Além desses estados, na região norte foi demonstrada a presença de 13 casos de CBM diagnosticadas nos ambulatórios dermatológicos de Manaus no Estado do Amazonas (TALHARI *et al.*, 1980), destacando o Estado do Pará como a principal área endêmica do País com 325 casos registrados em 55 anos (SILVA *et al.*, 1999). Entre os anos de 2001 a 2014, foram diagnosticados na Unidade de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária “Dr. Marcello Candia” (URE Marcello Candia), localizada no município de Marituba no Estado do Pará, mais de 146 novos casos de CBM (Dados não publicados, URE Marcello Candia)

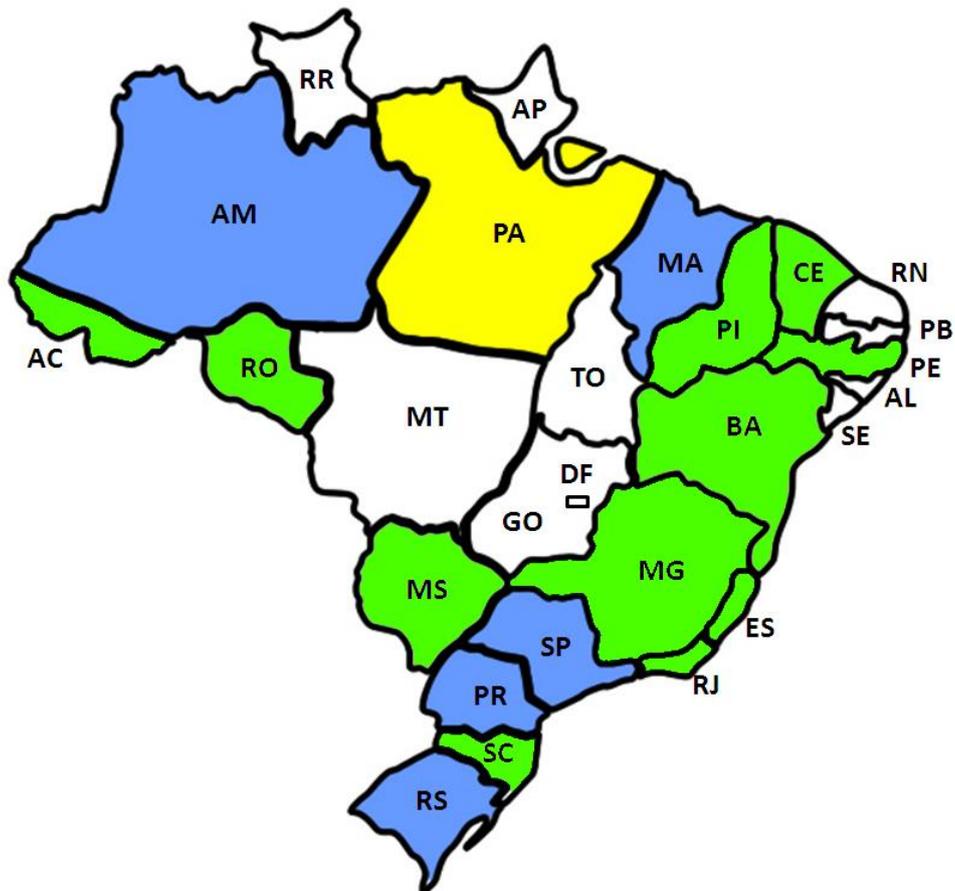


Figura 2: Distribuição nacional dos casos publicados de cromoblastomicose. Branco (sem registro de caso em revistas indexadas internacionais), verde (até 10 casos registrados), azul (entre 10 e 100 casos registrados) e amarelo (mais de 100 casos). Fonte: TALHARI *et al.*, 1980; MATTÊDE *et al.*, 1990; SILVA *et al.*, 1999; MINOTTO *et al.*, 2001; MARQUES *et al.*, 2006; CORREIA *et al.*, 2010; De BONA *et al.*, 2010)

1.3. AGENTES ETIOLÓGICOS

Diversos fungos melanizados estão envolvidos com a CBM. Os agentes etiológicos mais comuns pertencem aos gêneros *Cladophialophora* e *Fonsecaea*. *Cladophialophora carrionii* é o patógeno predominante em regiões secas e semidesérticas da Austrália, África do Sul, Venezuela e Cuba, enquanto *Fonsecaea pedrosoi* é o agente mais comum encontrado em zonas tropicais úmidas, como Amazônia e regiões temperadas da América Latina. Outros fungos dematiáceos têm

sido associados com menor frequência a CBM, entre eles *Phialophora verrucosa*, *Rhinochrysiella aquaspersa*, *Exophiala dermatitidis*, *Exophiala jeanselmei*, *Exophiala spinifera* (AMENN, 2010; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011)

Segundo a classificação taxonômica, *F. pedrosoi*, pertence ao reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Chaetothyriales*, família *Herpotrichiellaceae* e gênero *Fonsecaea*; agrupando quatro espécies: *F. brasiliensis*, com distribuição estritamente ambiental; *F. monophora* e *F. nubica* com distribuição asiática e africana respectivamente (XI, *et al.*, 2009; NAJAFZADEH, *et al.*; 2011), e *F. pedrosoi*, sendo esta espécie o principal agente etiológico da CBM no Estado do Pará.

Fonsecaea pedrosoi quando cultivado em meio Ágar Sabouraud apresenta colônia de aspecto aveludado, anverso com coloração variando entre o verde-oliva e o negro (**Figura 3A**), sendo o reverso também enegrecido, porém estas características macroscópicas não caracterizam o agente etiológico, pois diferentes espécies apresentam o mesmo aspecto. A identificação só é obtida após a realização de microcultivo em lâmina, com visualização microscópica das características micromorfológicas, como por exemplo, *F. pedrosoi* é reconhecido pela presença de hifas septadas, ramificadas, melanizadas e com predomínio de conidiação do tipo *Cladosporium* (**Figura 3B**), embora todos os padrões de conidiação possam ser encontrados. (LACAZ *et al.*, 2002)

Outra característica dos agentes da CBM é o dimorfismo não clássico, que é a habilidade que alguns fungos possuem de mudar sua morfologia micelial quando em vida saprofítica para uma morfologia leveduriforme quando em fase parasitária. A forma leveduriforme dos agentes da CBM é conhecida como células escleróticas ou “células muriformes”, ou “corpúsculo de Medlar”. (LOPEZ & MENDEZ TOVAR, 2007) (**Figura 3C**).

Ressalte-se que a diferenciação das hifas ou conídios em células escleróticas no tecido do hospedeiro, é um aspecto biológico interessante, cujo mecanismo ainda não está totalmente esclarecido, embora o conhecimento do controle experimental destes processos tenha aumentado nos últimos anos (WALTER *et al.*, 1982; SANTOS *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008).

Um exemplo notável deste avanço refere-se à indução de células escleróticas *in vitro*. Inicialmente, a ideia era de que o pH ácido de 2.5 (IBRAHIM-GRANET *et al.*, 1985) e baixas concentrações de íons Ca^{+2} (MENDOZA *et al.*, 1993) seriam 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 trabalhoso e longo, gerando poucos estudos fisiológicos com estas formas teciduais de *F. pedrosoi* quando comparado com os outros estados morfológicos deste fungo (SANTOS *et al.*, 2007).

SILVA e colaboradores em 2008, propuseram a obtenção de células escleróticas através de meios de cultura naturais obtidos da biomassa de *Theobroma grandiflorum* e *Bactris gasipaes*, 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 respectivamente, sem a necessidade de agitação e/ou controle de temperatura.

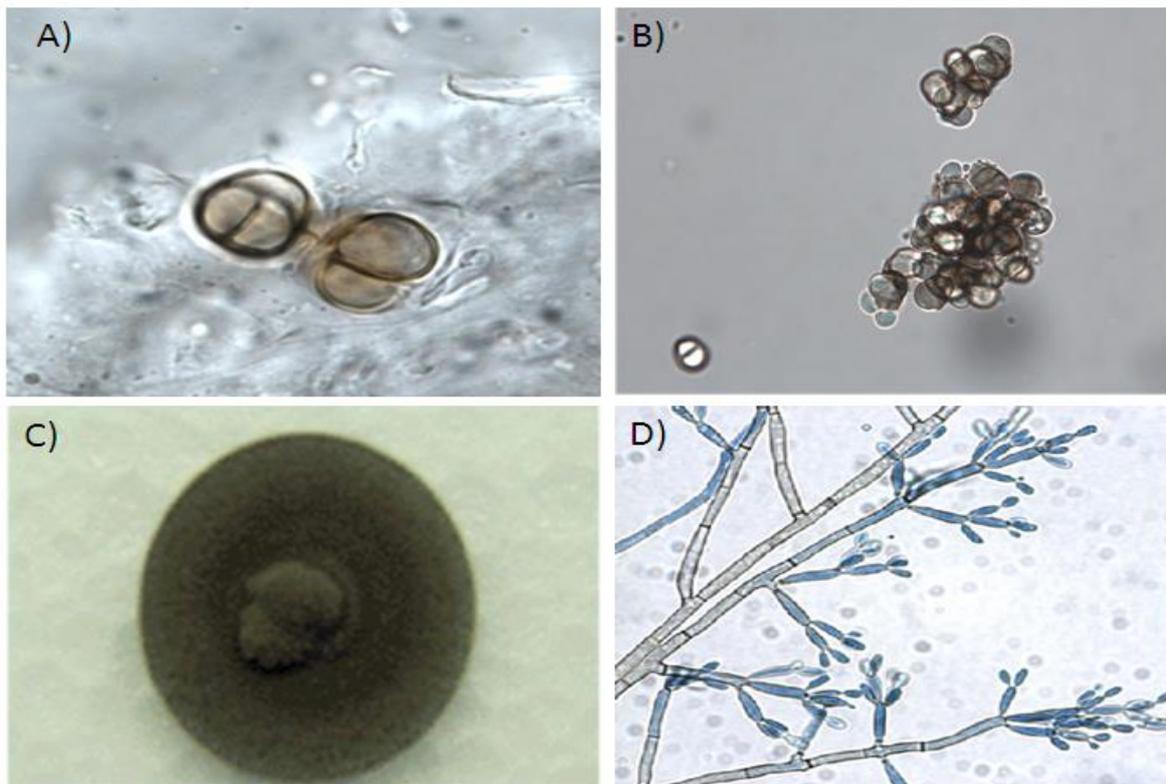


Figura 3: Aspectos Morfológicos *Fonsecaea pedrosoi*. (A) Células escleróticas obtidas em exame micológico direto, (B) Células escleróticas obtidas *in vitro* por meio quimicamente definido, (C) Macroscopia da cultura do fungo que apresenta colônia de aspecto aveludado e coloração negra e (D) Microcultivo revelando a formação de hifas septadas e conidióforos tipo cladosporium. Fonte: Arquivo do Laboratório de Dermatologia-Imunologia.

1.4. HABITAT

Os fungos causadores da CBM se encontram na natureza e são de vida saprobiótica, ocorrendo, provavelmente, na vegetação, no solo e plantas em decomposição (MINOTTO *et al.*, 2001; LUPI *et al.*, 2005). Estudos demonstraram o isolamento de diversos tipos de fungos dematiáceos de várias espécies vegetais. No Brasil, estudo realizado por SALGADO e colaboradores em 2004, identificaram *F. pedrosoi* nos espinhos de *Mimosa pudica*, popularmente conhecida como dormideira ou maria-fecha-a-porta. Dois anos depois, no Estado do Maranhão este mesmo fungo foi isolado da casca do coco babaçu (*Orbignya phalerata*) (MARQUES *et al.*, 2006).

De acordo com QUEIROZ-TELLES (1992), *P. verrucosa*, tem sido isolado em diversos países, de materiais como plantas, gramas e solo. Já a espécie *C. carrionii* foi isolado a partir de espinhos de cactus de uma zona semi-árida endêmica da Venezuela (ZEPENFELDT, 1994).

1.5. ASPECTOS CLÍNICOS

De acordo com Carrión, a CBM apresenta aspectos clínicos bastante diversificados, classificando-a em cinco diferentes formas: nodular, tumoral, verrucosa, placa e cicatricial (CARRIÓN, 1950). 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, número de lesões, presença de complicações e resposta ao tratamento (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 1992).

A forma leve foi definida como uma única lesão nodular ou em placa com menos de 5 cm de diâmetro; forma moderada como uma lesão única ou múltipla, com menos de 15 cm de diâmetro, que abrangesse uma ou duas regiões cutâneas e a forma grave, como lesões extensas envolvendo áreas da pele adjacentes ou não adjacentes e também incluindo os tipos tumorais e cicatricial (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 1992).

Em 2005, SALGADO e colaboradores, descreveram uma nova forma clínica, CBM cutânea difusa, caracterizada por lesões verrucosas disseminadas pelo tegumento. No ano de 2009, esse mesmo grupo publicou três casos de lesões localizadas, papuloescamosas, agrupadas em uma lesão única com formato anular, denominada de CBM cutânea localizada anular. Esses fatos levaram a uma nova proposta de classificação baseada no aspecto que as lesões assumem ao longo da evolução da doença, como observado na **figura 4**.

Cutânea localizada			Cutânea Difusa
Anular	Em placa	Nodular	
			
6 a 12 meses		9 meses a mais que 3 anos	
Tratamento com itraconazol 200mg/dia			

Figura 4: Classificação da cromoblastomicose de acordo com o aspecto das lesões.

A CBM pode ser dividida em dois grupos: CBM cutânea localizada, que pode ser: (A) Anular, (B) Em placa (C) Nodular e CBM cutânea Difusa (D).

Fonte: SALGADO, C. G. CROMOBLASTOMICOSE. In: LEÃO, RNQ. (Org.). Medicina Tropical e Infectologia na Amazônia. 1. ed. Belém: Samauma editorial, 2013.

1.6.DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da CBM pode ser realizado através do exame micológico direto, a partir do raspado das lesões na pele, onde são observadas as células escleróticas, que são similares para os diferentes agentes etiológicos, e caracterizam-se pela coloração acastanhada devido a produção de melanina na parede celular (CUNHA *et al.*, 2005). Essa síntese de melanina ocorre por meio da via do dihidroxinaftaleno (DHN), em organelas denominadas melanossomos (CUNHA *et al.*, 2005; CUNHA *et al.*, 2010). As células escleróticas são estruturas esféricas que tem como característica a septação multiplânaria facilmente visualizada em exame micológico direto.

A identificação dos agentes etiológicos tem sido feita por meio do microcultivo em lâmina, podendo-se inferir as espécies de acordo com o tipo de conidiação mais prevalente: o tipo cladosporium caracteriza-se por apresentar conidióforos de comprimento variado, eretos, escuros e ramificados próximo ao ápice. Os conídios são

marrom-claros, de forma e tamanhos variados, ovóides, cilíndricos e irregulares. Geralmente apresentam duas escaras (disjuntoras) escuras resultantes da união de um conídio com o outro; o tipo rhinocladiella possui conidióforo nodoso com esporulação acropleurógena; o tipo phialophora possui estruturas em forma de jarro (fiálides), formadas ao longo das hifas dos quais se originam os conídios, ficando dispostos de forma aglomerada na parte superior das fiálides (LACAZ *et al.*, 2002).

1.7. TRATAMENTO DA CROMOBLASTOMICOSE

O tratamento da CBM é um dos mais difíceis e várias terapias têm sido utilizadas, pois não existe um tratamento padronizado para esta doença (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2012). A terapia é longa e sujeita a recidivas, e dependendo da situação clínica e da extensão das lesões, os procedimentos terapêuticos podem variar (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Entre os métodos terapêuticos utilizados destaca-se: farmacoterapia, terapias físicas e combinação de ambas. Na farmacoterapia, diferentes esquemas terapêuticos, com o uso da anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol, tiabendazol e cetoconazol, foram utilizados nas últimas décadas, entretanto com baixa taxa de cura (CASTRO, 1992; MINOTTO *et al.*, 2001 e QUEIROZ-TELLES *et al.*, 1992). Quanto aos métodos físicos, incluem a termoterapia, crioterapia e a terapia fotodinâmica, podendo ainda ser utilizadas cirurgias convencionais ou a laser, indicadas em casos de lesões iniciais ou de pequena extensão. Algumas vezes, os antifúngicos são administrados simultaneamente a estas terapias diminuindo o risco do surgimento de novas lesões (ANDRADE *et al.*, 2004; AMEEN, 2009; BONIFAZ *et al.*, 1997; POIRRIEZ *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2003 E LYON *et al.*, 2011).

Associações terapêuticas têm apresentado bons resultados, como por exemplo, os sinergismos entre itraconazol e terbinafina (GUPTA *et al.*, 2002), anfotericina-B e 5-fluorcitosina (POIRREZ *et al.*, 2000), 5-fluorcitosina e itraconazol (BONIFAZ *et al.*, 2004), terbinafina e voriconazol (DABOIT *et al.*, 2013), anfotericina-B e terbinafina (DABOIT *et al.*, 2013). Entretanto, o uso associado de antifúngicos também pode apresentar algumas desvantagens, como por exemplo: aumento do risco de aparecimento de reações adversas aos medicamentos (RAM) e interações medicamentosas desfavoráveis, portanto, devem ser realizados com cautela (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 1992). Neste contexto, os testes de suscetibilidade antifúngica *in vitro* são considerados a melhor estratégia para a seleção do fármaco mais apropriado (POIRREZ *et al.*, 2000).

Além disso, o sucesso terapêutico depende de outros fatores tais como: tipo de lesão, adesão ao tratamento, estado de saúde do paciente, diversidade dos agentes etiológicos e a sensibilidade aos fármacos. (BONIFAZ *et al.*, 2004; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 1992 e LOPEZEZ & MENDEZ TOVAR, 2007). Sabe-se que a diversidade dos agentes etiológicos pode influenciar diretamente a suscetibilidade às drogas, com altas variações entre diferentes cepas analisadas (ANDRADE *et al.*, 2004), demonstrando a necessidade de estudos que avaliem a sensibilidade aos fármacos antifúngicos, o que pode servir como parâmetro para ajustes de doses e mudanças no esquema terapêutico, resultando em maior eficiência na evolução clínica.

Por outro lado, alguns trabalhos demonstraram que o ITZ, em diferentes esquemas terapêuticos, pode ser a melhor escolha para o tratamento. SHEISHIMA e colaboradores em 2004, mostraram que o ITZ é eficaz para pacientes com CBM em doses de 100, 200 e 400 mg/dia, administrado isoladamente ou associado a criocirurgia, sendo empregado mais comumente em doses que variam entre 200 e 400 mg/dia, que

parecem ser mais eficazes e bem toleradas pelos pacientes (BONIFAZ *et al.*, 2001; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2003). Em outro estudo UNGAKORN e REANGCHAINAM em 2006, demonstraram que o uso pulsado de 400 mg/dia deste medicamento é mais econômico e apresenta melhores resultados do que o regime diário convencional entre 200 e 400 mg/dia, embora a duração do tratamento dependa dos casos individualmente. Desta forma, apesar da ocorrência mundial dessa doença, e da dificuldade no tratamento, a literatura ainda é escassa em relação a trabalhos que estabeleçam o perfil de suscetibilidade dos agentes da CBM.

Dentre os trabalhos que avaliaram a sensibilidade *in vitro* dos agentes da CBM, poucos correlacionaram a CIM com a evolução clínica, mostrando a necessidade de se estabelecer, não somente um perfil de resistência dessas cepas, mas a sua relação com o tipo de lesão e a evolução da doença. Outro problema agravante na compreensão desta patologia é seu tempo de tratamento, o qual, dependendo do tipo de lesão, pode ser de até 36 meses, entretanto a maioria dos trabalhos faz o acompanhamento de no máximo 24 meses (RESTREPO *et al.*, 1988) ou fazem apenas avaliação da cepa (CALIGIORNE *et al.*, 1999, DENG *et al.*, 2013). Neste contexto seria de grande valor a realização de estudos mais detalhados e com acompanhamento mais prolongado, se possível durante todo o período de tempo necessário para a cura desses pacientes.

1.8. TESTE DE SENSIBILIDADE *in vitro* AOS AGENTES ANTIFÚNGICOS

Testes de suscetibilidade aos antifúngicos são indicados para as seguintes situações: pacientes submetidos à profilaxia antifúngica, infecção por espécie com perfil de sensibilidade pouco conhecido, falha terapêutica e avaliação da seleção de cepas resistentes durante o tratamento. Através desses testes de suscetibilidade o clínico pode alterar a estratégia terapêutica, aumentar a dose do fármaco, mudar o antifúngico

utilizado ou fazer combinação de fármacos. (CUENCA-ESTRELLA & RODRIGUEZ-TUDELA, 2002).

Em 1982, o *National Committee for Clinical of Laboratory Standards* (NCCLS), atualmente denominado Instituto de Padronização de Laboratórios Clínicos (CLSI) organizou um subcomitê de peritos para padronização dos testes de suscetibilidade de fungos a fármacos antifúngicos, no tratamento de micoses profundas. Dois estudos multicêntricos já haviam demonstrado variabilidade inaceitável nos resultados obtidos de CIM para ANF- B, 5-FLU e CTZ, em relação a leveduras estudadas em diferentes concentrações (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2002). 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 NCCLS, selecionou após 14 anos de várias pesquisas, alguns dos principais estudos que forneceram dados para adequada padronização das provas de suscetibilidade de leveduras a antifúngicos (LACAZ *et al.*, 2002).

Em 2004, o CLSI publicou o documento M38-A, estabelecendo o método referência para determinação da sensibilidade dos fungos filamentosos aos agentes antifúngicos. Nesse documento, foram propostos parâmetros para testes com *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* e *Sporothrix schenckii* na fase filamentosa. Porém, testes para avaliar a suscetibilidade em fungos dimórficos como, por exemplo, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum* não foram alvo do estudo. Os antifúngicos avaliados foram: fluconazol, cetoconazol, itraconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol, flucitosina e anfotericina B.

Em 2008, o CLSI publicou um novo documento (M38-A2) em atualização ao anterior, padronizando o teste de sensibilidade com mais agentes etiológicos que causam infecções fúngicas cutâneas e invasivas como as espécies *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Pseudallescheria boydii* (*S.apiospermum*), *S. prolificans*, a forma miceliana de *Sporothrix schenckii*, zigomicetos, dermatófitos e fungos demáceos. Além disso, outros antifúngicos foram adicionados ao documento como: terbinafina, griseofulvina, ciclopirox e os equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina). Para realização do teste de sensibilidade de forma padronizada e confiável, uma série de medidas deve ser seguida de modo a não haver influência nos resultados. Dentre essas medidas destaca-se: preparo do inóculo, tempo e temperatura incubação, composição do meio cultivo e o pH do meio e leitura da concentração inibitória mínima.

2. JUSTIFICATIVA

Como exposto anteriormente, a CBM é uma doença de distribuição mundial, e o Estado do Pará ocupa o 2º lugar no mundo em números de casos registrados, sendo considerado uma região endêmica. Este perfil epidemiológico mostra a necessidade e relevância de que mais pesquisas sejam realizadas, possibilitando o melhor conhecimento desta patologia.

Além das características epidemiológicas, outro aspecto igualmente importante é a dificuldade de cura da CBM. Pela falta de padronização do tratamento e baixa taxa de cura (apenas cerca de 30%), é importante que seja feita a identificação dos isolados clínicos e a avaliação da suscetibilidade *in vitro*, principalmente considerando a escassez de dados sobre suscetibilidade de fungos negros aos antifúngicos disponíveis. Ressalta-se a importância do presente estudo, pois o perfil de suscetibilidade dessas cepas pode servir como base para o direcionamento do tratamento, melhorando as taxas de cura, assim como para a melhor identificação de cepas sensíveis ou resistentes, diante das normas atualmente disponíveis.

Adicionalmente, o ITZ, medicamento mais usado em nosso Estado, apresenta marcada variabilidade inter e intra-individual na sua farmacocinética, o que compromete o estabelecimento da relação dose, concentração plasmática e eficácia clínica do tratamento. Portanto, é imprescindível a dosagem das concentrações plasmáticas do ITZ e de seu metabólito o ITZOH, que apresenta atividade duas vezes maior que o fármaco inicial.

Desta forma, a associação de um quadro epidemiológico importante do ponto de vista regional, porém de alcance mundial, com a carência de dados de suscetibilidade de fungos negros aos antifúngicos disponíveis, e com a alta variabilidade farmacocinética e

baixa eficácia do ITZ na cura da CBM, justificam fortemente a realização deste trabalho, que poderá indicar novos caminhos para o melhor tratamento e monitoramento dos casos.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de cepas de agentes de CBM, isoladas de pacientes atendidos na URE Marcello Candia, frente aos antifúngicos itraconazol, terbinafina, cetoconazol, anfotericina, posaconazol, voriconazol, caspofungina, 5-fluorocitosina e fluconazol.

3.2 Específicos

- 3.2.1 Descrever o perfil epidemiológico da CBM no Estado do Pará, a partir de pacientes atendidos na Unidade de Referência em Dermatologia Sanitária do Estado do Pará Dr. Marcello Candia.
- 3.2.2 Identificar os agentes causadores da CBM por biologia molecular.
- 3.2.3 Determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações fungicidas mínimas (CFM) de diferentes antifúngicos frente aos isolados clínicos de *Fonsecaea* spp.
- 3.2.4 Correlacionar as CIMs do itraconazol com os tipos de lesão e com a evolução clínica dos pacientes.
- 3.2.5 Dosar as concentrações plasmáticas de itraconazol, e de seu metabólito hidroxitraconazol e relacionar com a resposta clínica ao tratamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 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.

4.2 PACIENTES COM CROMOBLASTOMICOSE

Foram avaliados 41 pacientes atendidos na Unidade de Referência em Dermatologia Sanitária do Estado Pará Dr. Marcello Candia sediado no município de Marituba (URE Marcello Candia).

Participaram do estudo indivíduos de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos, moradores dos Estados do Pará e do Maranhão, os quais faziam uso de ITZ por via oral, em doses diárias de 200, 400 mg ou até 600 mg/dia. Independente da forma clínica, todos os pacientes iniciaram o tratamento utilizando 200 mg/dia de ITZ. A evolução do quadro com o surgimento de novas lesões ou com a estagnação da melhora clínica, definiram o aumento da dose diária para 400 mg/dia , divididos em duas tomadas, após o almoço e após o jantar.

Vale ressaltar que dos 41 pacientes atendidos na URE Marcello Candia, três foram submetidos a mudança no esquema terapêutico com aumento da dose de 400 para 600 mg/dia, assim como, avaliação da CIM e CFM antes e depois do aumento na dosagem de ITZ.

A evolução clínica dos pacientes foi avaliada por médico dermatologista com experiência em micologia médica e os pacientes foram classificados em quatro grupos, dependendo da evolução: 1) CURA, quando não havia mais sinais clínicos de atividade da doença, como por exemplo lesões verrucosas, os pacientes eram submetidos a nova

biópsia para histopatologia, exame micológico direto e cultura. O ITZ era prescrito para mais três meses de tratamento, e ao retornar os pacientes recebiam “alta por cura”, com a orientação de comparecer ao ambulatório anualmente, ou ao surgimento de novas lesões; 2) MELHORA, definida pela diminuição do tamanho das lesões; 3) SEM MELHORA, quando não havia alteração das lesões e; 4) PIORA, quando surgiam novas lesões ao longo tratamento.

Todos os pacientes que participaram deste estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido devidamente aprovado pelo Comitê de Ética.

4.3 PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS FÚNGICAS

Os 41 isolados clínicos foram obtidos por meio de raspagem das lesões dos pacientes portadores de CBM atendidos na URE Marcello Candia. Após o diagnóstico laboratorial, as amostras foram semeadas em Agar Mycosel (Becton Dickinson, NJ, USA), observando-se o crescimento de colônias verde escuro, com uma superfície aveludada, após 14 dias de crescimento à temperatura ambiente. Para identificação microscópica, foi realizada a técnica de microcultivo em lâmina para identificação genérica do fungo responsável pela doença. A coleta de material é parte do procedimento padrão para o diagnóstico e posterior tratamento dos pacientes (RIDDELL,1950).

4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A identificação molecular dos agentes causadores da CBM foi realizada no laboratório de microbiologia molecular da UFPR (Universidade Federal do Paraná), onde foram identificadas 22 espécies de *Fonsecaea* sendo 16 *F. pedrosoi* e 6 *F. monophora*. As outras 19 cepas ainda estão em processo de análise.

4.4.1 Obtenção da cultura monospórica

Para a identificação molecular, os isolados clínicos foram recultivados em meio ágar-batata (Sigma-aldrich, MO, USA) por um período entre 15 a 30 dias. A suspensão de inóculo foi preparada por raspagem suave da superfície da colônia usando um swab estéril umedecido com solução salina, a suspensão foi homogeneizada em vortex por um minuto. Em seguida, a suspensão de células foi mantida em repouso por dois minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril e a contagem de conídios foi feita em câmara de Neubauer. Esta suspensão foi diluída a uma concentração de 10^7 células/ml.

Uma alíquota de 100 µl da suspensão de conídios foi transferida para placas com ágar Sabouraud-Dextrose (Sigma-aldrich, MO, USA) e espalhada com auxílio de alça de drigalski. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 a 72h, até o surgimento das primeiras colônias. Após este processo, foi coletada uma colônia isolada que foi novamente repicada em meio ágar Sabouraud-Dextrose (Sigma-aldrich, MO, USA). O crescimento da cultura monospórica ocorre entre sete a dez dias.

4.4.2 Extração do DNA e identificação molecular

O processo de extração do DNA iniciou-se com a transferência de 1cm² de cultura monospórica pura para o eppendorf contendo 400 µl de tampão TEx (Sigma-Aldrich, MO, USA) em pH 9.0 e esferas de vidro (Sigma G9143, Sigma-Aldrich, MO, USA). O material fúngico foi homogeneizado em vortex Mobio (Bohemia, Nova Iorque, EUA) por um minuto, e em seguida foram adicionados 120 µl de uma solução de duodecil sulfato de sódio a 10% e 10 µl de proteinase K (Sigma-Aldrich, MO, USA)

e incubado durante 30 min a 55 °C em banho-maria. Esta mistura foi agitada em vortex Mobio durante 3 min.

Após este período, adicionou-se 120 µl de cloreto de sódio a 5 M e 65 µl de solução de brometo de cetiltrimetilamonio a 10 % (Sigma- Aldrich, MO, USA) e o material foi incubado por 60 min a 55 °C. Depois, esta mistura foi agitada em vortex por 3 minutos, e transferiu-se cuidadosamente 700 µl de uma solução constituída por clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1, os quais foram centrifugados a 14.000 rpm/5min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf juntamente com 225 µl de acetato de amônia a 5M (Sigma-Aldrich, MO, USA), misturado cuidadosamente, incubado por 30 min em água gelada e centrifugado a 14.000 rpm/5 min a 4 °C.

O sobrenadante foi novamente transferido para um novo eppendorf com 510 µl de álcool isopropílico e centrifugado a 14.000 rpm/5min a 4 °C e finalmente, o sobrenadante foi lavado com 1000 µl de etanol gelado a 70%. Após secagem a temperatura ambiente, o pellet foi ressuspendido com 100 µl de tampão TE (Sigma-Aldrich, MO, USA) e 1,5 µl de RNase (Sigma-Aldrich, MO, USA) e incubado a 37 °C por 20-30 min. As espécies foram identificadas com base de espaçador interno transcrito (ITS), de acordo com NAJAFZADEH *et al.*, 2011.

4.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE *in vitro* A ANTIFÚNGICOS

4.5.1 Preparação e diluições dos antifúngicos

Como descrito pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) M38-A2, para estudo de suscetibilidade *in vitro*, os antifúngicos foram preparados em concentrações 100X em relação às concentrações finais. Inicialmente, as soluções-estoque de Itraconazol (ITZ; Sigma-aldrich, MO, USA), Terbinafina (TBF; Sigma-aldrich, MO, USA), Cetoconazol (CTZ; Sigma-aldrich, MO, USA), Anfotericina B (ANF; Sigma-aldrich, MO, USA), Voriconazol (VCZ; Sigma-aldrich, MO, USA), Posaconazol (PCZ; Sigma-aldrich, MO, USA) e Caspofungina (CAS; Sigma-aldrich, MO, USA) foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-aldrich, MO, USA) em concentrações variando de 1600 a 3.13 µg/ml.

Posteriormente, estas concentrações foram diluídas 1:50 em RPMI (Sigma-aldrich, MO, USA) tamponado com MOPS (Sigma-aldrich, MO, USA) atingindo concentrações de 32 µg/ml a 0.0625 µg/ml, 2X a concentração final desejada para estes fármacos.

A Fluorocitosina (5-FLU, Valeant, Brasil) e o Fluconazol (FCZ; Sigma-aldrich, MO, USA) foram preparados e diluídos em água destilada estéril em intervalos de concentrações de 6400 a 12.5 µg/ml, atingindo o intervalo de 128 a 0.25 µg/ml após diluição 1:50 com RPMI (Sigma-aldrich, MO, USA) tamponado com MOPS (Sigma-aldrich, MO, USA).

Cada antifúngico foi distribuído, em alíquotas de 100 µl, em placa de microtitulação (Kartell S.P.A., Milão, Itália), desde a coluna 2 até a 11, correspondendo cada coluna uma concentração. As placas foram então congeladas à temperatura de -80°C até o momento do uso.

4.5.2 Preparação da suspensão de conídios

Todos os isolados clínicos foram cultivados em ágar batata-dextrose (Sigma-aldrich, MO, USA) por 10 dias a 30 °C. A suspensão de inóculo foi preparada por raspagem suave da superfície da colônia usando um swab estéril umedecido com solução salina, contendo 0.05% Tween 40, homogeneizada em vortex por cerca de 5 min. As partículas pesadas na suspensão de células foram deixadas em repouso por 3 a 5 min em temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril e a densidade celular ajustada entre 0.15 a 0.17 (68 a 71% de transmitância) por espectrofotômetro (530 nm) que correspondia, aproximadamente, a uma faixa de 10^5 - 10^6 cels/ml. Esta suspensão foi diluída 1:50 em meio de cultivo sintético RPMI (Sigma-aldrich, MO, USA), tamponado com MOPS (Sigma-aldrich, MO, USA).

4.5.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

No dia da realização dos testes, alíquotas de 100 µl de cada inóculo de conídio foram colocadas nos poços das placas contendo os antifúngicos, de forma que a concentração final analisada para o ITZ, TBF, CTZ, ANF, PCS, VCZ e CAS foi de 16 a 0.03 µg/ml e de 64 a 0.125 µg/ml para o FCZ e 5-FC. Em cada placa foram colocados 6 inóculos de diferentes pacientes, sendo as duas últimas fileiras (G e H) destinadas ao controle de qualidade, realizada com cepas de referência *Candida Krusei* (ATCC 6258) e *Candida Parapsilosis* (ATCC 22019). A coluna 1, funcionou como controle de esterilidade do meio (CE) do teste, pois foi colocado somente o meio RPMI tamponado com MOPS, sem antifúngico e sem fungo. A coluna 12 funcionou como controle do crescimento (CC) sendo preparado com 100 µl de RPMI tamponado com MOPS e 100 µl de inóculo (**Figura 5**).

O ensaio de sensibilidade *in vitro* foi realizado em placas estéreis de 96 poços com o fundo em U, como descrito pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) M38-A2. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada após cinco dias de incubação a 30 °C, sendo definida como a mínima concentração do fármaco capaz de inibir em 100% o crescimento visual do fungo quando comparado com o controle do crescimento, bem como gerar uma diferença estatística significativa na leitura de DO a 530 nm em leitor de microplaca (Dynex Technologies, Chantilly, EUA) quando comparado com os grupos onde houve crescimento. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.5.4 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Após a leitura da CIM para os conídios, determinou-se a concentração fungicida mínima (CFM). Uma alíquota de 30 µl dos poços em que não se observou crescimento foi transferida para placas com ágar Sabouraud-Dextrose (Sigma-aldrich, MO, USA). Incluíram-se no teste um controle positivo (controle de crescimento) e um controle negativo (controle de esterilidade). As placas foram incubadas por cinco dias a 30 °C e o crescimento foi visualmente observado. Determinou-se como CFM a concentração mínima em que impede o crescimento fúngico. Esses ensaios foram realizados em duplicata.

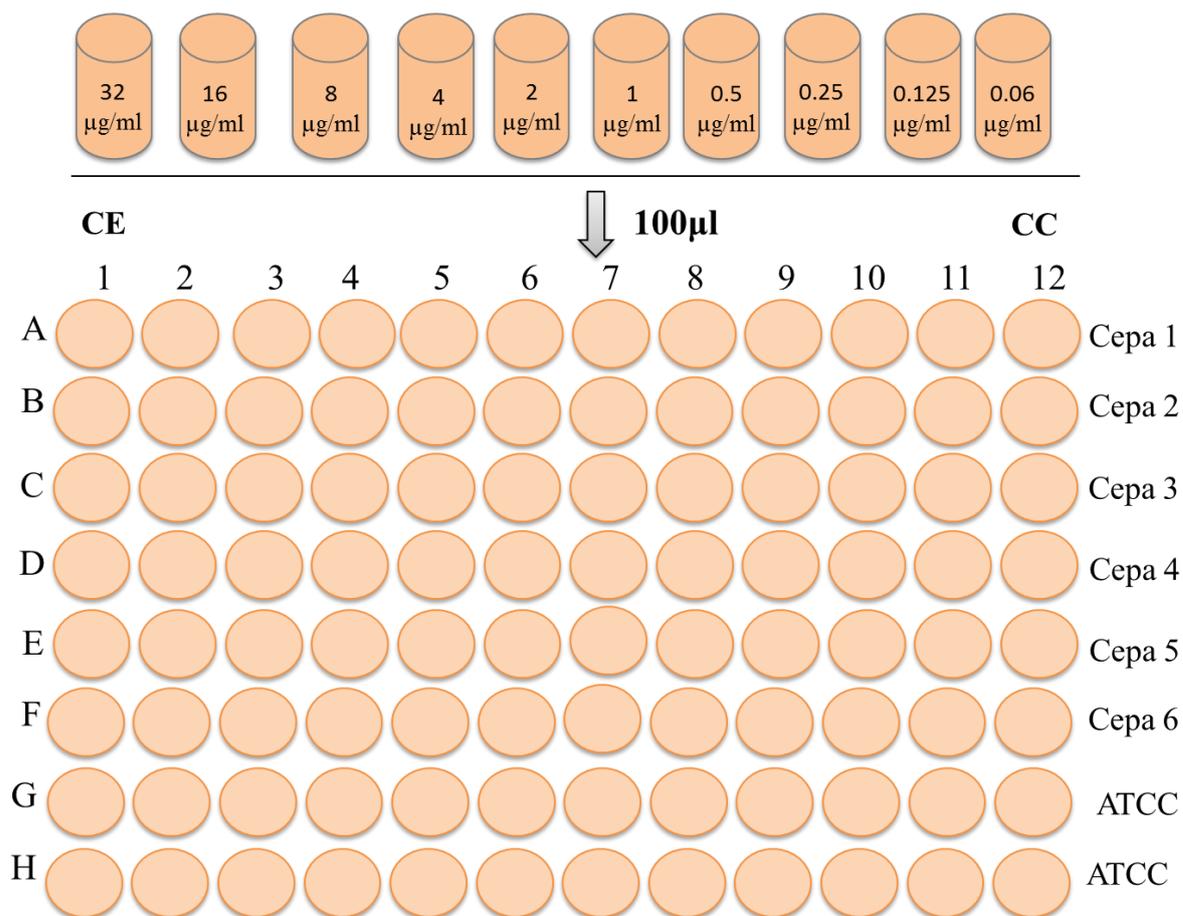


Figura 5: Distribuição dos antifúngicos diluídos nas microplacas: Os antifúngicos foram distribuídos em diferentes concentrações desde a coluna 2 até a 11 correspondendo cada coluna uma concentração. As colunas 1 (CE) e 12 (CC) funcionaram como o controle de esterilidade do meio e o controle de crescimento dos inóculos respectivamente.

4.6 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE ITRACONAZOL E HIDROXITRACONAZOL

A determinação das concentrações plasmáticas de ITZ e ITZOH foi realizada em amostras de plasma de 18 pacientes com CBM atendidos na URE Marcello Candia, os quais tinham ingerido o medicamento por mais 15 dias, onde o estado de equilíbrio havia sido atingido. Quinze dos 18 pacientes fizeram uso somente da dose de 200 mg/dia de ITZ, enquanto que os três pacientes que não responderam à dose de 200 mg/dia e nem à dose de 400 mg/dia, foram submetidos ao tratamento com 600 mg/dia. Todas as amostras foram coletadas 24 horas após a ingestão da dose diária do medicamento e antes da próxima dose. Os pacientes foram orientados a ingerir as cápsulas de ITZ, nas doses diárias de 200, 400 ou 600mg/dia, durante as refeições para assegurar uma boa absorção.

Para determinação de ITZ e ITZOH nas amostras de plasma, foram coletados 5 ml de sangue total em tubos tipo vacuotainer, empregando-se EDTA como anticoagulante. A seguir, foram centrifugados a 2000 rpm/10 min, e o plasma foi separado e armazenado em tubo eppendorf a -80 °C até o processamento. As dosagens plasmáticas de ITZ e ITZOH foram feitas no Laboratório de Toxicologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará.

4.6.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Varian-USA), composto de módulo de bombeamento isocrático ProStart 300 e detector ultravioleta. A coluna analítica empregada foi a X-Tera LC18 (Waters, Saint Quentin-en-Yvelines, França), com 15 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e

partícula de 5 µm, com temperatura de operação de 25 °C. Para aquisição dos dados foi utilizado o sistema Star Chromatography Workstation versão 6.0 (Varian, USA).

As condições ideais para separação dos fármacos foram obtidas com fase móvel constituída por acetonitrila (Sigma-aldrich, MO, USA) e água (60:40 v/v), ajustado o pH 3.0 com solução de ácido fosfórico (Sigma-aldrich, MO, USA) a 50 %. A vazão da fase móvel foi 1 ml/min, a detecção em 258 nm e o tempo de desenvolvimento cromatográfico de 15 minutos.

4.6.2 SOLUÇÕES PADRÃO E CURVA DE CALIBRAÇÃO

As soluções estoques de ITZ (Sigma-aldrich, MO, USA) e ITZOH (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e do padrão interno, CTZ (Sigma-aldrich, MO, USA) foram preparadas em concentração de 1mg/ml e armazenadas a -20 °C. Três soluções de trabalho (1 µg/ml de ITZ, 1 µg/ml de ITZ e 50 µg/ml CTZ) foram preparadas imediatamente antes do uso, por diluições apropriadas em metanol.

A curva de calibração foi elaborada a partir dos calibradores, contendo ITZ e ITZOH, em concentração variando de 50 ng/ml a 750 ng/ml, os quais foram submetidos ao procedimento de extração do plasma.

4.6.3 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE ITRACONAZOL E HIDROXITRACONAZOL DO PLASMA

Em 200 µl de plasma dos pacientes, foram adicionados 200 µl de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0.5 M e 200 µl de sulfato de zinco (ZnSO₄) 1 M, seguidos por agitação em vortex durante 30 segundos e centrifugação a 4000 rpm/10 min. Ao sobrenadante, foi adicionada uma alíquota de 100 µl de CTZ em concentração de 100

$\mu\text{g/ml}$ e 1 ml de éter metil terc butílico (Sigma-aldrich, MO, USA), homogeneizou-se por 15 min e centrifugou-se a 4000 rpm/10 min. A fase aquosa foi descartada e a orgânica evaporada em banho-maria a 55°C . O resíduo foi ressuspendido com 100 μl da fase móvel, agitado em vórtex por 30 segundo e injetado no cromatógrafo líquido (GUBBINS *et al.*,1998).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos neste trabalho foram analisados pelo programa GraphPad 5® (GraphPad Software, CA, USA). A média geométrica (MG) representa uma medida de tendência central de uma série valores em progressão geométrica. Os valores para determinação da CIM_{50} e CIM_{90} , bem como, a faixa de valores obtidos são parâmetros para relatar os resultados de teste de suscetibilidade quando vários isolados de uma determinada espécie são testados. O CIM_{50} representa o valor de CIM em que 50% ou mais dos isolados em uma população teste são inibidas, é equivalente ao valor mediano da CIM. O CIM_{90} representa o valor de CIM em que 90 % ou mais das cepas dentro de uma população teste são inibidas, obtida pelo percentil 90. Outros testes utilizados foram Kruskal-Wallis e o teste Man Whitney onde diferença entre os grupos foram consideradas significantes quando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5. 1. VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS

Após a identificação dos isolados clínicos de *Fonsecaea* spp coletados de 38 pacientes com CBM atendidos na Unidade de Referência em Dermatologia Sanitária do Estado do Pará Dr. Marcello Candia, avaliamos as características demográficas e clínicas gerais destes pacientes (**Tabela 1**), e verificamos que o sexo masculino foi predominante com 98 % dos casos. A média de idade no momento do diagnóstico foi de 57.44 anos, variando de 26 a 80 anos. Quanto a principal atividade ocupacional, a maioria era formada por agricultores rurais em 65.8 % dos casos, porém, outras ocupações como mecânico, marceneiro e vigilante foram informadas (**Tabela 2**).

Tabela 1: Características demográficas e clínicas dos 38 pacientes com CBM atendidos na URE Marcello Candia.

n	Sexo	Idade	Município	Ocupação	Local da lesão	Tipo de lesão	Agente etiológico
1	M	54	Currálinho	Agricultor	Abdomen	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>
2	M	69	Breves	Mecânico	Tornozelo e Pé	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>
3	M	63	Santa Izabel	Agricultor	Joelho	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>
4	M	45	Inhangapi	Agricultor	Perna	Nodular	nd
5	M	50	Igarapé-Açu	Agricultor	Perna	Nodular	<i>F. monophora</i>
6	M	42	Cametá	Agricultor	Perna	Placa	nd
7	M	68	Terra Alta	Vigilante	Tornozelo	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>
8	M	47	Melgaço	Agricultor	Perna	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>
9	M	48	Capanema	Agricultor	Perna	Nodular	nd
10	M	49	Castanhal	Agricultor	Tornozelo	Placa	<i>F. monophora</i>
11	M	63	Breves	Agricultor	Tornozelo	Nodular	nd
12	M	63	Bragança	Agricultor	Perna	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>
13	M	39	Turiaçu-MA	Agricultor	Tornozelo	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>
14	M	47	Benevides	Agricultor	Perna	Nodular	nd
15	M	54	Capanema	Agricultor	Perna	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>
16	M	71	S. Domingos do Capim	Agricultor	Perna	Nodular	nd
17	M	69	São Francisco	Aposentado	Braço	Difusa	<i>F. pedrosoi</i>
18	M	78	Capanema	Aposentado	Braço	Placa	<i>F. monophora</i>
19	M	57	Bacuri-MA	Agricultor	Perna	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>
20	M	48	Peixe-Boi	Agricultor	Pé	Nodular	nd
21	M	75	Serrano- MA	Aposentado	Tornozelo	Nodular	nd
22	M	72	Colares	Agricultor	Perna	Placa	nd
23	M	58	Breves	Agricultor	Pé	Nodular	nd
24	M	53	Breves	Agricultor	Perna	Nodular	<i>F. monophora</i>
25	M	26	Mocajuba	Agricultor	Joelho	Placa	<i>F. monophora</i>
26	M	68	Breves	Agricultor	Joelho	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>
27	M	29	Inhangapi	Marceneiro	Perna	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>
28	M	62	Marituba	Agricultor	Tornozelo	Nodular	nd
29	M	48	Bragança	Pescador	Tornozelo	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>
30	M	69	Bragança	Aposentado	Perna	Nodular	nd
31	M	76	Castanhal	Aposentado	Dedo da mão/Perna	Difusa	<i>F. monophora</i>
32	M	63	Abaetetuba	Aposentado	Pé	Nodular	nd
33	F	69	Bragança	Aposentada	Omo-plata	Placa	nd
34	M	70	Tracuateua	Aposentado	Perna	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>
35	M	54	Ourem	Agricultor	Joelho	Placa	nd
36	M	33	Bragança	Agricultor	Braço	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>
37	M	80	Breves	Aposentado	Perna	Nodular	nd
38	M	54	S. Miguel do Guamá	Agricultor	Tornozelo	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>

nd = não determinado

Tabela 2: Distribuição epidemiológica de acordo com idade, sexo e ocupação dos pacientes com CBM.

Variáveis	Número de Casos	(%)
Idade (anos)		
25 – 45	5	13.16
45 – 65	21	55.26
65 – 80	12	31.58
Total	38	100.0
Sexo		
Masculino	37	97.36
Feminino	1	2.63
Total	38	100.0
Ocupação		
Agricultor	25	65.80
Aposentado	9	23.68
Outros	4	10.52
Total	38	100.0

Em relação à distribuição geográfica, os pacientes avaliados eram provenientes de 22 municípios do Estado do Pará e 3 municípios do Estado do Maranhão. O Estado do Pará é dividido em seis mesorregiões, e a maior parte dos pacientes eram originários da região nordeste (**Tabela 3**). Quanto à distribuição anatômica das lesões, podemos observar que 84.21 % das lesões estavam localizadas nos membros inferiores, 10.52 % nos membros superiores e 5.26 % no tronco (**Tabela 4**). Na **tabela 5** temos a descrição dos tipos de lesões, sendo a mais comum a lesão nodular com 76.31 % dos casos.

Tabela 3: Distribuição geográfica dos pacientes com CBM atendidos na URE Marcello Candia.

Mesorregiões	Número de Casos	(%)
Baixo Amazonas	0	0.0
Marajó	9	23.70 %
Nordeste	21	55.25 %
Sudeste	0	0.0
Sudoeste	0	0.0
Região Metropolitana de Belém	5	13.15 %
Estado do Maranhão	3	7.9 %

Tabela 4: Região anatômica das lesões dos pacientes com CBM atendidos na URE Marcello Candia.

Local das Lesões	Número de Casos	(%)
Membros Superiores	5	10.52
Membros Inferiores	34	84.21
Abdomen	2	5.27

Tabela 5: Tipo de lesões dos pacientes com CBM atendidos na URE Marcello Candia.

Tipo de Lesões	Número de Casos	(%)
Nodular	29	76.31
Placa	10	18.42
Difusa	2	5.26

5.2. SENSIBILIDADE *in vitro*

Na **tabela 6** estão descritos os CIMs dos isolados de todos os pacientes, apresentando os valores máximos e mínimos de CIM, média geométrica da CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀ para os nove agentes antifúngicos estudados.

Primeiramente, usando os valores de CIM, buscamos identificar quais drogas seriam mais eficazes, o que nos permitiu dividir as drogas em três grandes grupos (**Figura 6**). O primeiro grupo formado pelo PCZ, VCZ e ITZ foram os antifúngicos com melhor atividade, apresentando $CIM \leq 0.53 \mu\text{g/ml}$, sendo que os valores de CIMs destes fármacos apresentaram diferença significativa entre eles ($p < 0.001$) (**Figura 7**). Os outros resultados descritos na **tabela 6** (CIM₅₀ e CIM₉₀) reforçam a eficácia destes antifúngicos.

Já o grupo formado pelos antifúngicos TBF, CTZ, ANF e CAS demonstraram $CIM > 0.83 \mu\text{g/ml}$, valores significativamente maiores que o grupo anterior do PCZ, VCZ e ITZ ($p < 0.05$) e apesar de não ser considerada resistência medicamentosa, indicam uma baixa eficácia dessas moléculas frente aos agentes etiológicos da CBM. O terceiro grupo, representado pelo FCZ e 5-FLU, mostraram valores elevados, com $CIM > 64 \mu\text{g/ml}$. Esses valores mostraram diferença significativa ($p < 0.001$) quando comparados com o primeiro grupo (PCZ, VCZ, ITZ) e também refletem a ineficácia destes agentes antifúngicos no tratamento da CBM (**Figura 6**).

Tabela 6: Avaliação da suscetibilidade *in vitro* dos isolados clínicos de *Fonsecaea* spp em relação a nove agentes antifúngicos.

Isolados clínicos de <i>Fonsecaea</i> spp	Concentração Inibitória Mínima (µg/ml)								
	ITZ	TBF	CTZ	ANF	5-FLU	FCZ	PCZ	VCZ	CAS
1	0.5	2	1	4	>64	>64	0.25	0.25	> 16
2	0.5	0.5	1	4	>64	32	0.25	0.25	> 16
3	0.5	2	2	8	>64	>64	0.25	0.25	> 16
4	1	1	2	4	>64	>64	0.25	0.25	> 16
5	0.5	0.5	2	2	>64	>64	0.25	0.5	> 16
6	1	4	2	8	64	>64	0.25	0.5	16
7	0.5	0.5	1	4	>64	32	0.25	0.125	> 16
8	0.5	1	1	4	32	>64	0.25	0.5	8
9	0.5	1	1	2	32	>64	0.5	0.25	> 16
10	0.5	1	0.5	8	>64	>64	0.5	0.25	16
11	0.25	1	0.5	4	>64	32	0.25	0.25	16
12	1	0.5	1	4	64	>64	0.5	0.25	16
13	1	4	8	8	>64	>64	0.5	0.5	> 16
14	0.5	0.5	1	2	>64	64	0.5	0.25	> 16
15	1	1	1	4	>64	64	0.125	0.25	16
16	0.5	2	1	8	>64	>64	0.5	0.5	4
17	0.5	1	0.5	4	>64	16	0.25	0.25	16
18	0.5	1	1	8	>64	32	0.25	0.25	> 16
19	1	1	2	8	>64	>64	0.125	0.25	16
20	0.25	2	0.5	2	>64	64	0.25	0.25	8
21	0.5	0.5	2	8	>64	>64	0.5	0.25	> 16
22	1	1	4	4	>64	>64	0.5	0.5	16
23	0.5	0.25	1	2	64	>64	0.5	0.25	> 16
24	1	0.25	0.5	4	64	64	0.5	0.25	> 16
25	0.5	1	1	4	>64	64	0.25	0.25	> 16
26	0.25	0.25	0.5	1	64	64	0.25	0.25	16
27	0.5	0.5	1	4	64	>64	0.25	0.125	> 16
28	0.25	1	1	2	>64	>64	0.25	1	4
29	1	1	2	8	64	>64	0.25	0.25	> 16
30	0.5	0.5	1	4	>64	64	0.125	0.5	> 16
31	0.5	0.5	1	4	64	>64	0.25	0.25	> 16
32	0.5	0.5	1	2	64	64	0.25	0.5	16
33	0.5	0.5	1	4	>64	64	0.25	0.5	16
34	0.5	0.5	1	4	>64	64	0.25	0.25	8
35	1	4	2	8	64	>64	0.25	0.5	> 16
36	0.5	0.5	2	4	>64	64	0.25	0.25	> 16
37	0.5	1	2	4	>64	>64	0.25	0.25	> 16
38	0.5	1	1	4	>64	>64	0.5	0.25	> 16
MG	0.53	0.80	1.18	4	61.70	57.83	0.28	0.30	14.08
MG máx. e mín.	1-0.25	4-0.25	8-0.5	8-1	>64-32	>64-16	0.5-0.125	1-0.125	4 > 16
CIM₅₀	0.5	1	1	4	64	64	0.25	0.25	16
CIM₉₀	1	2	2	8	64	64	0.5	0.5	16

MG da CIM: Média Geométrica da Concentração inibitória Mínima, MG máx e MG mín: Média Geométrica máxima e mínima, CIM₅₀ e CIM₉₀: concentração de antifúngicos capaz de inibir, respectivamente, 50 % e 90 % dos isolados clínicos de *Fonsecaea* spp.

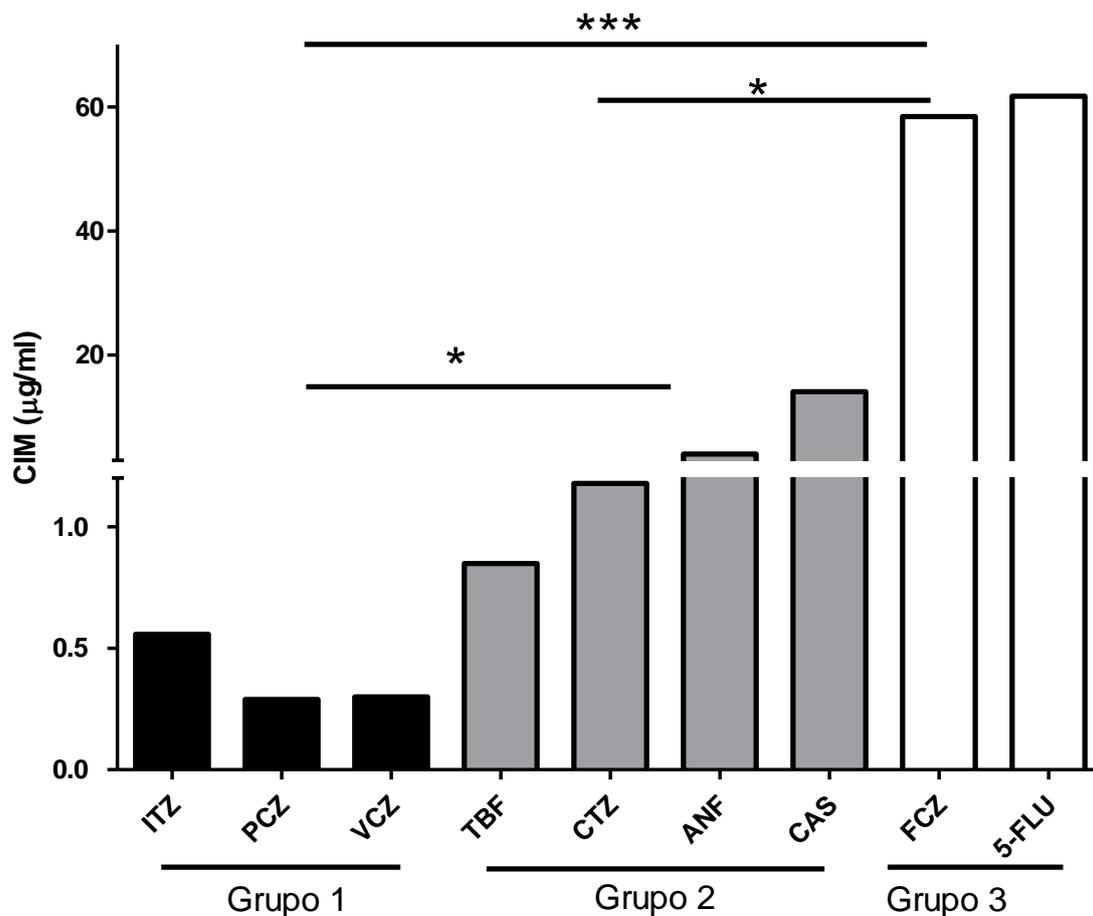


Figura 6: Perfil de suscetibilidade de 38 isolados clínicos de *Fonsecaea* spp em relação a 9 antifúngicos de acordo com CIM. Os fármacos foram divididos em 3 grupos, sem diferença estatística entre os fármacos que compõem os grupos dois e três. O Grupo 1, apresentou os menores valores de CIM, e conseqüentemente de melhor eficiência. * $p < 0.05$ para Grupo 1 vs Grupo 2 e Grupo 2 vs Grupo 3. *** $p < 0.001$ para Grupo 3 vs Grupo 1. Valores estão expressos média geométrica.

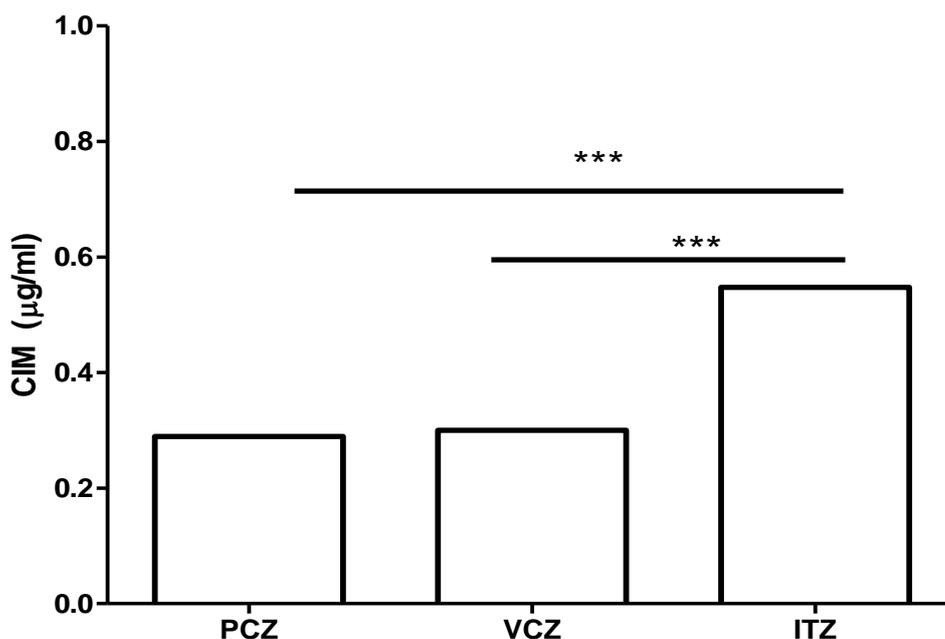


Figura 7: Perfil de suscetibilidade de 38 isolados clínicos de *Fonsecaea* spp em relação a três antifúngicos de acordo com CIM. *** $p < 0.001$ para ITZ vs PCZ e ITZ vs VCZ, não houve diferença entre PCZ vs VCZ $p > 0.05$. Valores expressos em média geométrica.

Após a determinação dos valores CIM, seguimos no experimento avaliando outro parâmetro de eficácia das drogas, através da determinação da concentração dos fármacos que é capaz de causar a morte do agente etiológico, chamada de Concentração Fungicida Mínima (CFM), descrita na **tabela 7**, apresentando os valores máximos e mínimos de CFM, média Geométrica de CFM, CFM₅₀ e CFM₉₀ para os nove agentes antifúngicos estudados.

Os resultados mostraram que o PCZ apresentou o melhor desempenho neste parâmetro, CFM = 4.07 µg/ml, valor estatisticamente menor que os valores do ITZ ($p < 0.05$) e VCZ ($p < 0.05$) (**Figura 8**), indicando que o PCZ teve a melhor resposta fungicida frente ao agente etiológico desta micose subcutânea.

Os resultados obtidos para os antifúngicos CTZ, TBF e ANF-B revelaram uma CFM ≥ 8.06 µg/ml, valores significativamente maiores que ao PCZ ($p < 0,05$),

confirmando uma baixa eficácia quanto a sua capacidade fungicida, em comparação ao PCZ.

Para FCZ, 5-FLU e CAS não foi possível determinar a CFM, uma vez que no teste de CIM, estes fármacos atingiram o valor máximo na faixa de concentração testada que corresponde a 64 µg/ml para o FCZ e 5-FLU e 16 µg/ml para a CAS.

Tabela 7: Avaliação da Concentração Fungicida Mínima dos 38 isolados clínicos de *Fonsecaea* spp.

Isolados clínicos de <i>Fonsecaea</i> spp	Concentração Fungicida Mínima (µg/ml)								
	ITZ	TBF	CTZ	ANF	5-FLU	FCZ	PCZ	VCZ	CAS
1	1	4	2	8	nd	nd	4	16	nd
2	4	2	2	8	nd	>64	2	4	nd
3	1	4	2	16	nd	nd	2	8	nd
4	16	>16	>16	>16	nd	nd	8	8	nd
5	16	>16	8	>16	nd	nd	8	8	nd
6	8	16	16	>16	nd	nd	8	16	nd
7	8	8	>16	>16	>64	>64	8	8	nd
8	4	8	8	>16	nd	nd	2	16	>16
9	1	8	8	8	nd	nd	2	8	nd
10	>16	8	>16	>16	nd	nd	8	16	nd
11	2	8	>16	>16	nd	>64	2	4	nd
12	4	2	2	8	nd	nd	4	8	nd
13	2	8	8	>16	nd	nd	2	8	nd
14	>16	8	16	4	nd	nd	2	2	nd
15	4	>16	4	>16	nd	nd	8	1	nd
16	>16	>16	>16	>16	nd	nd	2	16	>16
17	2	8	>16	>16	nd	>64	16	2	nd
18	>16	16	16	8	nd	>64	16	16	nd
19	>16	>16	>16	>16	nd	nd	2	16	nd
20	16	>16	8	>16	nd	nd	1	4	>16
21	>16	16	16	>16	nd	nd	1	2	nd
22	>16	>16	8	8	nd	nd	8	4	nd
23	>16	>16	>16	>16	nd	nd	8	16	nd
24	8	2	8	>16	nd	nd	16	2	nd
25	16	16	16	16	nd	nd	2	16	nd
26	4	2	4	4	nd	nd	8	4	nd
27	>16	>16	>16	>16	nd	nd	4	8	nd
28	16	4	16	16	nd	nd	1	16	>16
29	8	4	2	16	nd	nd	16	16	nd
30	>16	>16	8	>16	nd	nd	1	1	nd
31	>16	2	1	8	nd	nd	4	16	nd
32	>16	>16	>16	>16	nd	nd	4	8	nd
33	>16	>16	16	>16	nd	nd	16	16	nd
34	1	>16	2	>16	nd	nd	1	1	>16
35	>16	>16	>16	>16	nd	nd	8	16	nd
36	>16	>16	>16	>16	nd	nd	16	16	nd
37	>16	>16	>16	>16	nd	nd	2	16	nd
38	>16	>16	>16	>16	nd	nd	8	16	nd
MG	8	9.08	8.60	13.09	-	-	4.07	7.04	-
MG máx. e mín.	>16-1	>16-2	>16-1	>16-4	-	-	16-1	16-1	-
CFM₅₀	16	16	16	16	-	-	4	8	-
CFM₉₀	16	16	16	16	-	-	16	16	-

MG da CFM: Média Geométrica da Concentração Fungicida Mínima, MG máx e MG mín: Média Geométrica máxima e mínima, CFM₅₀ e CFM₉₀: representam a menor concentração do antifúngico capaz de matar, respectivamente, 50 % e 90 % dos isolados clínicos de *Fonsecaea*. nd: Não determinada.

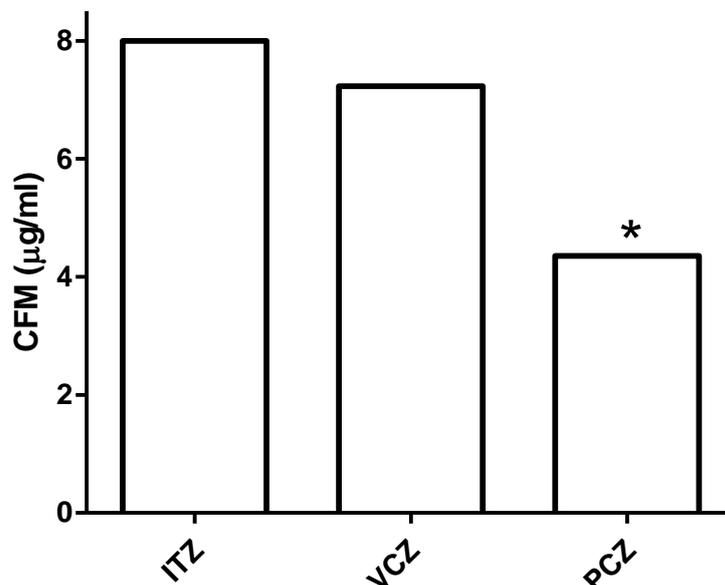


Figura 8: Perfil de suscetibilidade de 38 isolados clínicos de *Fonsecaea* spp em relação a ITZ, VCZ e PCZ, de acordo com CFM. * $p < 0,05$ para ITZ vs PCZ e VCZ vs PCZ não houve diferença entre ITZ vs VCZ $p > 0.05$. Valores expressos em média geométrica.

Após avaliar a eficácia dos fármacos *in vitro*, buscamos entender se existia diferença de sensibilidade entre as espécies identificadas através da biologia molecular. A **tabela 8** apresenta a média geométrica da CIMs, variação da CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀ para os isolados de *F. pedrosoi* e *F. monophora* obtidos dos pacientes com CBM.

Apesar de as espécies *F. pedrosoi* e *F. monophora* terem apresentado um perfil de sensibilidade semelhante, a espécie *F. monophora* mostrou-se mais sensível para a TBF e CTZ ($p < 0.05$). Porém, quando avaliamos as espécies isoladamente em relação aos antifúngicos, observamos que os fármacos mais eficientes foram o VCZ, PCZ e ITZ apresentando um CIM ≤ 0.55 $\mu\text{g/ml}$, sendo que os valores de CIMs destes fármacos apresentaram diferença significativa entre eles ($p < 0.05$).

Tabela 8: Avaliação da suscetibilidade *in vitro* dos 22 isolados clínicos de *Fonsecaea pedrosoi* e *Fonsecaea monophora* em relação a nove agentes antifúngicos.

Espécies (n) e antifúngicos avaliados	CIM ($\mu\text{g/ml}$)			
	Média Geométrica	Varição	CIM ₅₀	CIM ₉₀
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> (n=16)				
Itraconazol	0.55	0.25 - 1	0,5	1
Terbinafina	0.84	0.25 - 2	1	2.6
Cetoconaol	1.31	0.5 - 2	1	3.8
Anfotericina B	4.36	1 - 8	4	8
5-fluorocitocina	61.28	32 - > 64	64	64
Fluconazol	53.81	16 - > 64	64	64
Posaconazol	0.26	0.125 - 0.5	0.25	0.5
Voriconazol	0.25	0.125 - 0.5	0.25	0.5
Caspofungina	14.67	8 - > 16	16	16
<i>Fonsecaea monophora</i> (n=6)				
Itraconazol	0.5	0.5 - 1	0.5	1
Terbinafina	0.59 *	0.25 - 1	0.75	1
Cetoconaol	0.84 *	0.5 - 2	1	2
Anfotericina B	4.75	2 - 8	4	8
5-fluorocitocina	64	64 - > 64	64	64
Fluconazol	53.81	32 - > 64	64	64
Posaconazol	0.29	0.25 - 0.5	0.25	0.5
Voriconazol	0.25	0.25 - 0.5	0.25	0.5
Caspofungina	16	16 - > 16	16	16

*p < 0.05 para TBF *F. monophora* vs *F. pedrosoi*

*p < 0.05 para CTZ *F. monophora* vs *F. pedrosoi*

Após avaliar a eficácia dos fármacos *in vitro*, procuramos entender se a avaliação da sensibilidade das cepas poderia de fato se relacionar com a evolução clínica dos pacientes. Neste sentido, o ITZ foi escolhido como parâmetro, pois é usado para o tratamento da doença na URE Marcello Candia. Assim, separamos as cepas em quatro grupos de acordo com a avaliação clínica (**Figura 9**). Os resultados demonstraram que o grupo classificado como “piora” teve um valor de CIM ($0.90 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$) significativamente maior que o grupo “cura” ($0.45 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$, $p < 0.05$), “melhora” ($0.59 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$, $p < 0.05$) e sem melhora ($0.45 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$, $p < 0.05$). Não houve diferença significativa entre “cura” vs “melhora” ou “sem melhora” ($p > 0.05$).

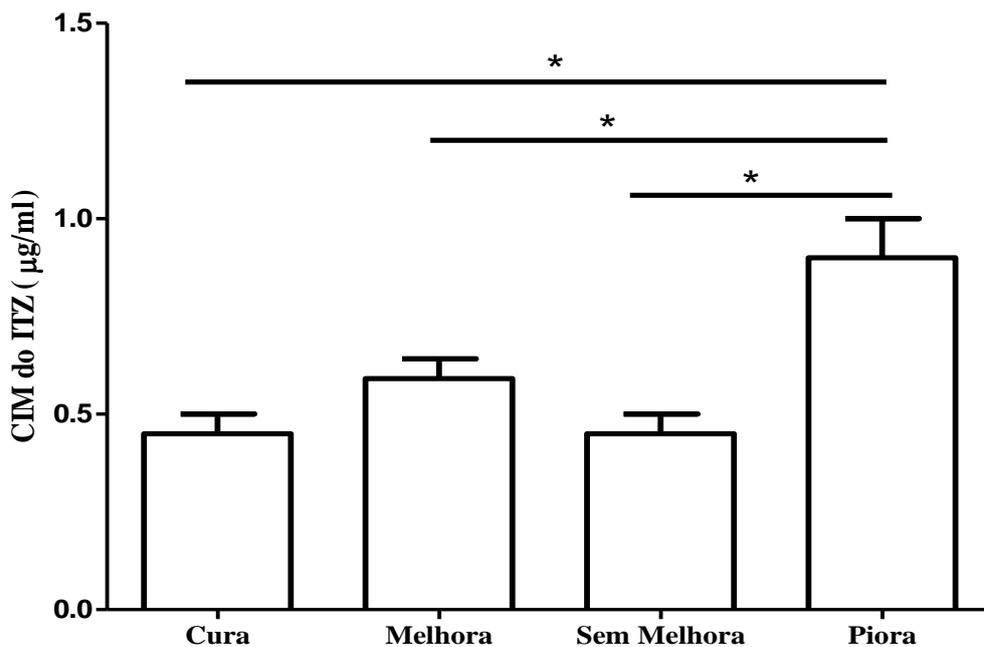


Figura 9: Relação entre a CIM e a evolução clínica. Valores de CIM são expressos em média \pm EPM. Os dados demonstraram que o grupo com piora ($n=5$) teve um valor médio de CIM de $0.90 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$, sem melhora ($n=5$) teve um valor médio de CIM de $0.45 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$, com melhora ($n=22$) $0.59 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ e cura ($n=6$) $0.45 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$, * $p < 0.05$ para comparação entre cura vs piora, melhora vs piora e sem melhora vs piora.



Figura 10: Evolução clínica dos pacientes com CBM. As figuras A e C demonstram as lesões dos pacientes antes do tratamento com ITZ 200 mg/dia e as figuras B e D após o tratamento, sendo B considerado cura e D paciente com melhora.

Outro aspecto importante no prognóstico dessa doença é o tipo de lesão, e para avaliar a correlação entre a lesão e a sensibilidade dos isolados clínicos, separamos os isolados em três grupos com os seguintes valores de média de CIM \pm EPM: nodular (0.58 ± 0.046), placa (0.57 ± 0.078) e difusa (0.75 ± 0.25). Os valores CIMs observados nesses grupos não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0.05$) (**Figura 10**).

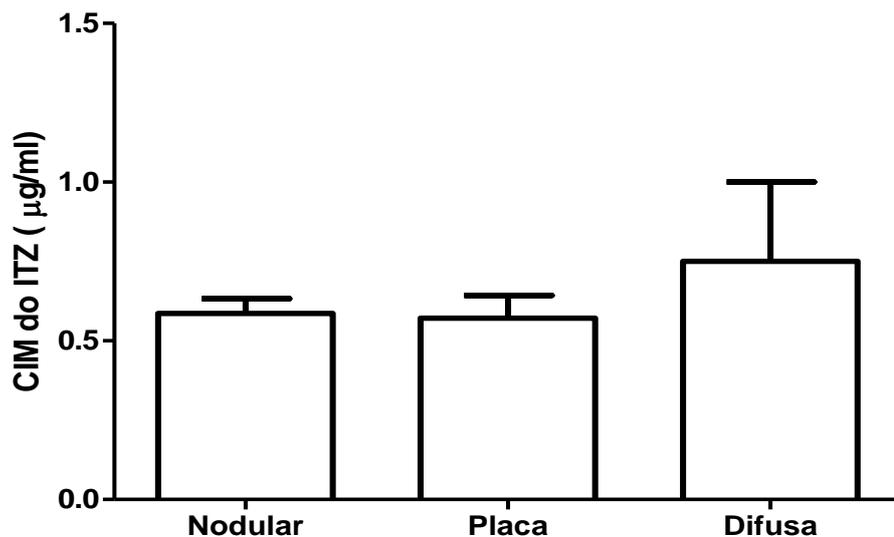


Figura 11: Relação entre a CIM do ITZ e as formas clínicas. Valores da CIM são expressos em média \pm EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados com $p > 0.05$.

5.3. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE ITZ E ITZOH NOS PACIENTES COM CBM

Outro importante fator para compreensão da evolução da doença é a determinação dos níveis plasmáticos do ITZ e seu metabólito ITZOH. Os resultados da dosagem nas 15 amostras de plasma dos pacientes com CBM que fizeram uso de 200 mg/dia mostraram concentrações para o ITZ variando de 55.3 a 548 ng/ml com valor médio de 179 ± 32 ng/ml e coeficiente de variação (CV) interindividual de 69 % (**Figura 12**). Para o ITZOH as concentrações variaram de 165 ng/ml a 1300 ng/ml com valor médio de 525 ± 82 ng/ml e CV de 60 % (**Figura 13**). A **figura 14** demonstra a somatória das concentrações de ITZ+ITZOH. Quando comparamos os níveis plasmáticos dos analitos, observamos que o ITZOH (525 ± 82 ng/ml) estava três vezes mais elevado no plasma dos pacientes, com diferença estatística significativa em comparação com o ITZ (179 ± 32 ng/ml) ($p= 0.0007$) (**Figura 15**).

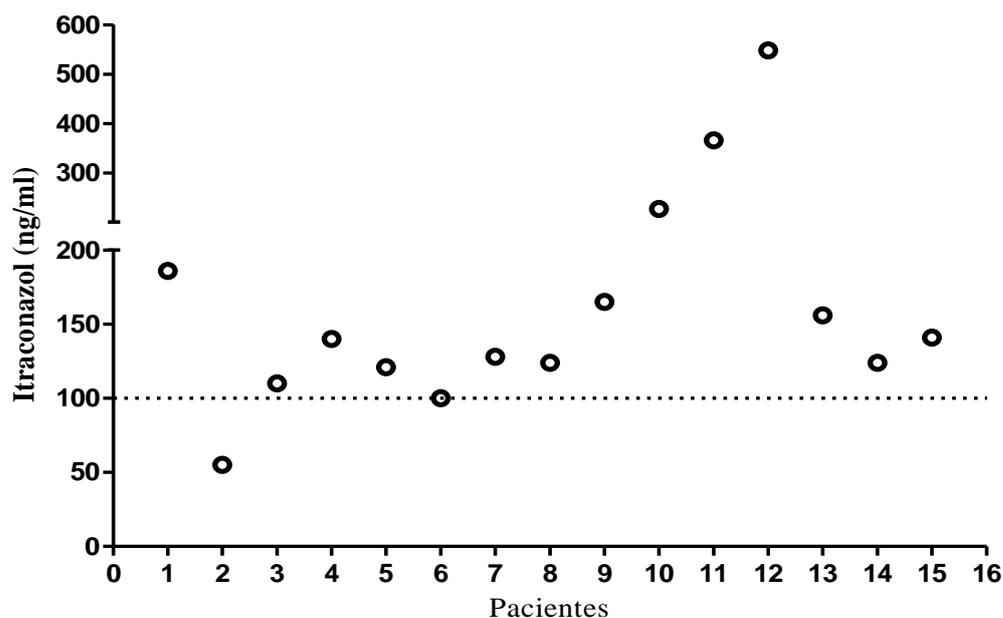


Figura 12: Concentrações plasmáticas de ITZ nos pacientes com CBM fazendo uso de 200 mg/dia. O Coeficiente de variação interindividual foi de 69 %. A linha pontilhada marca a concentração plasmática mínima de ITZ (100 ng/ml) referida como necessária para produzir um efeito terapêutico satisfatório (CAUWENBERGH, 1994).

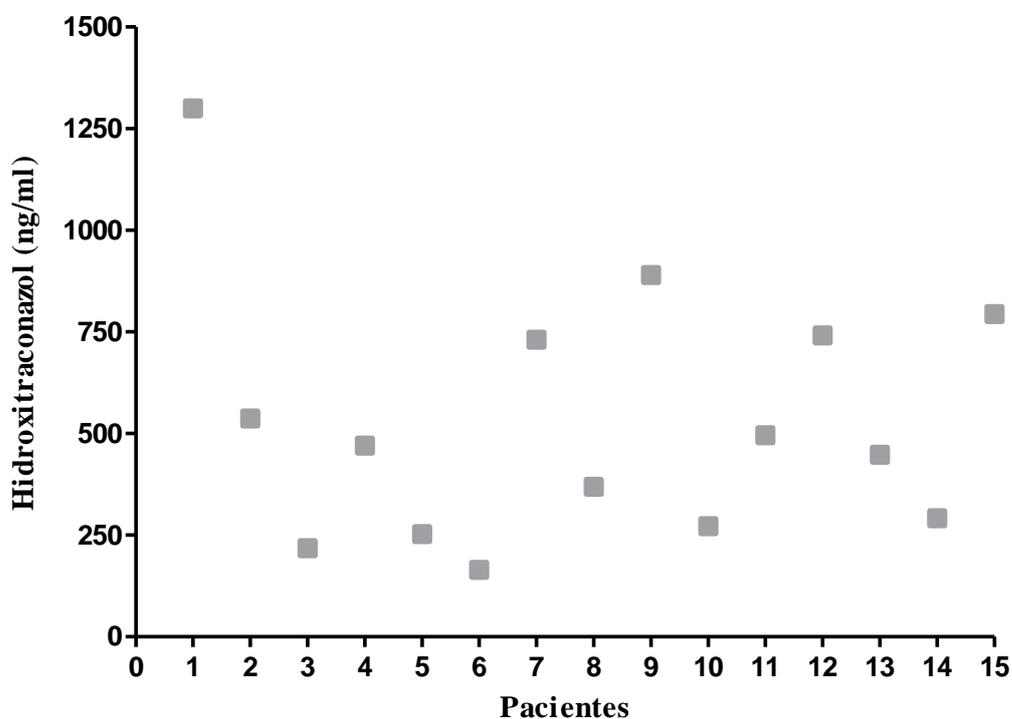


Figura 13: Concentrações plasmáticas de ITZOH nos pacientes com CBM fazendo uso de 200 mg/dia. O coeficiente de variação interindividual nos níveis plasmáticas de ITZOH foi de 60 %.

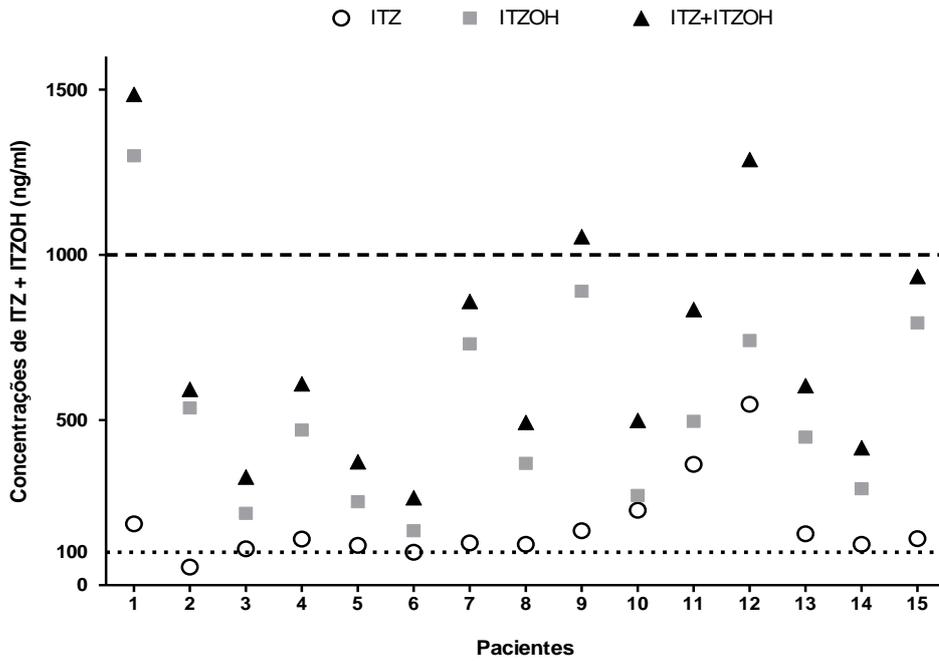


Figura 14: Somatória das concentrações plasmáticas de ITZ + ITZOH nos pacientes com CBM fazendo uso de 200 mg/dia. A linha tracejada marca o limite mínimo aceitável da somatória das concentrações plasmáticas do ITZ e ITZOH (1000 ng/ml) para efeito terapêutico satisfatório. A linha pontilhada marca a concentração plasmática mínima de ITZ (100 ng/ml) necessária para efeito terapêutico satisfatório (CAUWENBERGH, 1994; BEGG *et al.*, 2001).

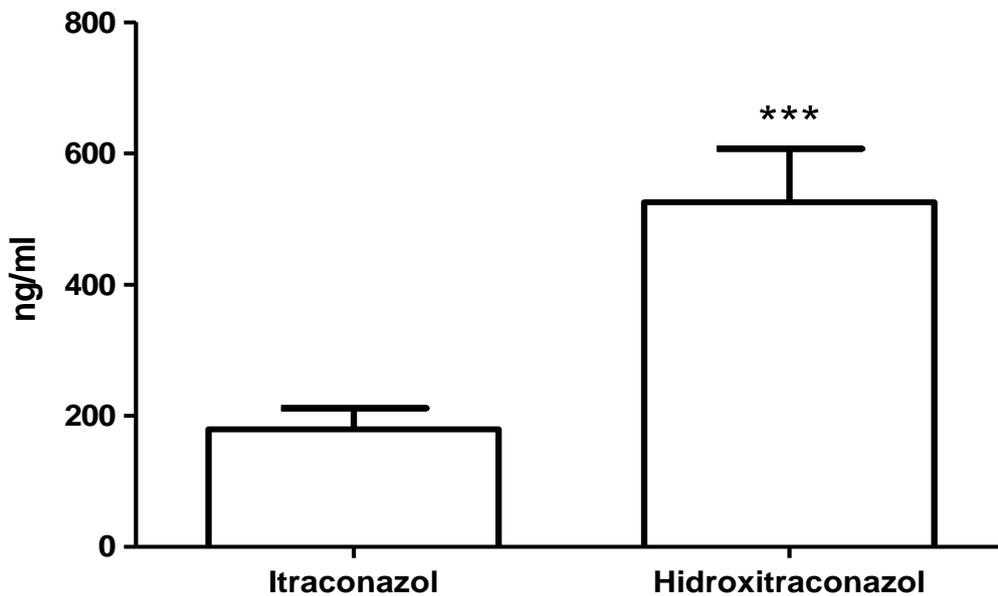


Figura 15: Diferença entre os níveis plasmáticos de ITZ e ITZOH em 15 amostras de pacientes com CBM. Os valores expressos em média \pm dp. *** $p < 0.001$ para comparação entre ITZ e ITZOH.

Para analisar a relação entre os valores plasmáticos de ITZ e ITZOH dosados no presente estudo e a evolução clínica, separamos os pacientes em dois grupos: melhor e não melhor. Quando comparamos os níveis de ITZ entre esses dois grupos, observamos que não houve diferença estatística significativa entre eles ($p= 0.7283$) (**Figura 16**). No entanto, quando comparamos os níveis de ITZOH, observamos que o grupo com melhora apresentou concentrações significativamente mais elevadas que o grupo sem melhora ($p= 0.0482$) (**Figura 17**).

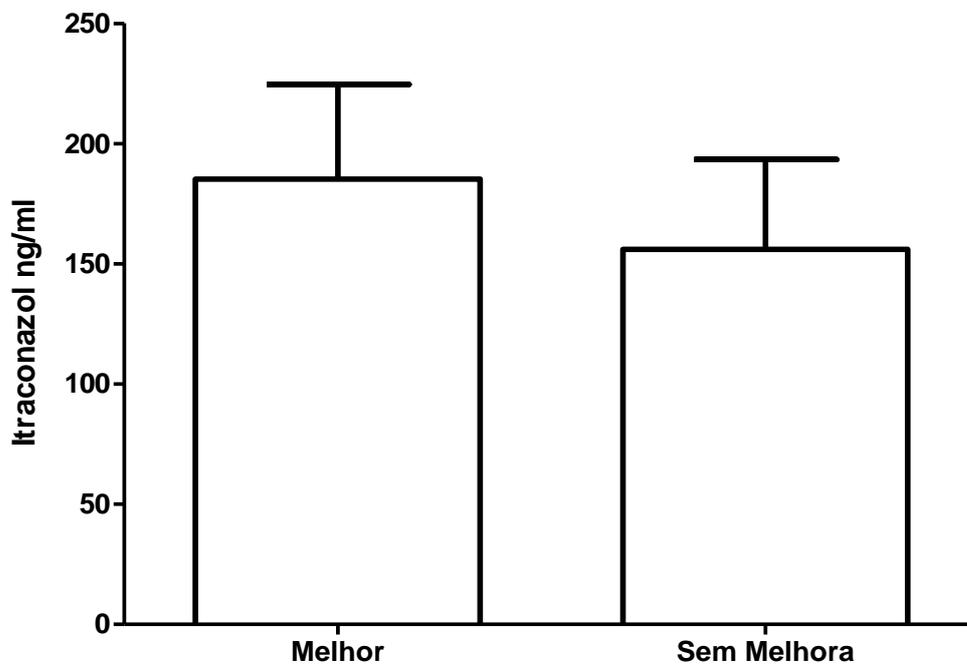


Figura 16: Relação entre as concentrações plasmáticas de ITZ e a evolução clínica. Os dados demonstram que o grupo com melhora ($n=12$) apresentou um valor médio de 216 ± 43.6 ng/ml e sem melhora ($n= 3$) 106 ± 14.5 ng/ml, ($p=0.728$), sem diferença estatística significativa. Valores são expressos em média \pm dp.

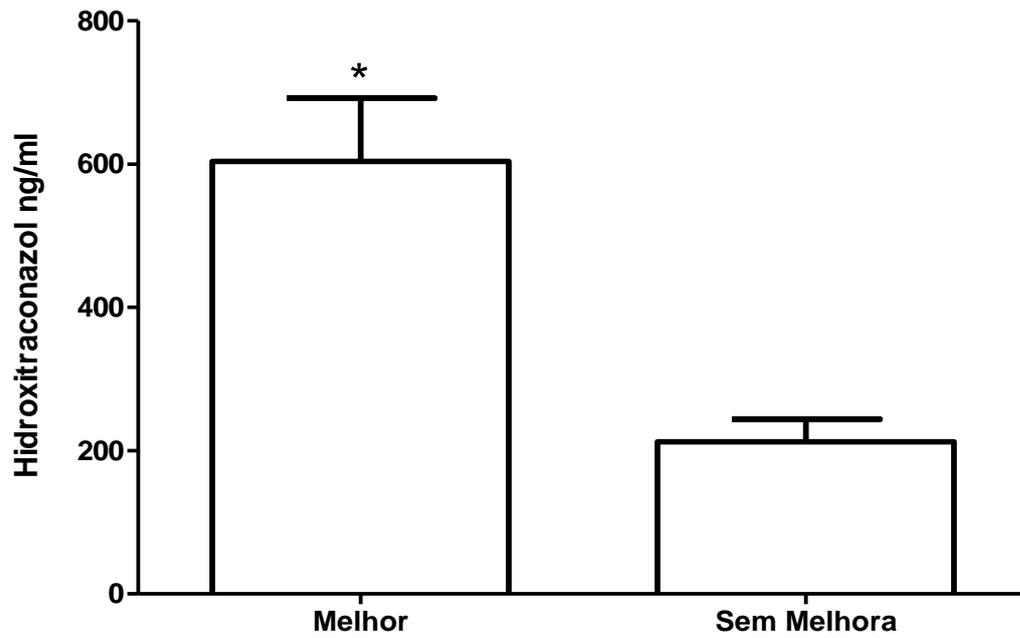


Figura 17: Relação entre as concentrações plasmáticas de ITZOH e a evolução clínica. Os dados demonstram que o grupo com melhora (n=12) apresentou um valor médio de 623.5 ± 96.3 ng/ml e sem melhora (n= 3) 248.2 ± 25 ng/ml, ($p=0.0482$) com diferença estatística significativa. Valores são expressos em média \pm dp.

5.4. ALTAS DOSES DE ITZ NO TRATAMENTO DA CBM

Três pacientes com CBM atendidos na URE Marcello Candia, que não apresentaram uma evolução favorável durante o tratamento convencional com 200 e posteriormente com 400 mg/dia de ITZ, foram submetidos à altas doses de ITZ, 600 mg/dia, divididos em duas administrações, após o almoço e após o jantar para garantir uma melhor absorção do fármaco. A média de idade dos pacientes no momento do diagnóstico foi de 63 anos (variando de 54 a 69 anos) e todos os pacientes eram agricultores rurais do sexo masculino (**Tabela 9**).

Apesar do incremento na dose administrada, o aumento na quantidade tomada não garante um aumento linear nos níveis plasmáticos. Por esse motivo, as dosagens plasmáticas do fármaco e seu metabólito se tornam indispensáveis no acompanhamento desses pacientes, bem como avaliação da função hepática e renal, através dos exames laboratoriais: TGO (transaminase glutâmica oxalacética), TGP (transaminase glutâmica pirúvica), ALP (fosfatase alcalina), GGT (gama glutamil transpeptidase), bilirrubina total e frações, creatinina e uréia. As análises bioquímicas foram realizadas somente após o aumento da dose para 600 mg/dia. (**Tabela 10**).

Tabela 9: Características epidemiológicas dos três pacientes com CBM.

Paciente	Idade	Sexo	Tempo de evolução	Município	Local da Lesão	Tipo de lesão	Agente etiológico
A	54	M	20 anos	Ourém	Perna	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>
B	63	M	10 anos	Breves	Perna	Nodular	<i>F. pedrosoi</i>
C	69	M	30 anos	São Francisco do Pará	Braço e Omoplata	Difusa	<i>F. pedrosoi</i>

O novo esquema terapêutico adotado no presente estudo, com 600 mg/dia, apresentou resultado satisfatório na evolução clínica, pois esses pacientes que já faziam o tratamento com ITZ por até 42 meses não relatavam melhora do seu quadro, o que aconteceu a partir do

momento que iniciaram o novo esquema terapêutico, sendo que em 2 meses já apresentavam regressão no tamanho das lesões, com diminuição do processo inflamatório e do prurido, caracterizando uma melhora do quadro clínico (Tabela 11) (Figura 18).



Figura 18: Evolução clínica do paciente B com CBM submetido à altas doses de ITZ. A figura A, demonstra as lesões nodulares do paciente quando fazia uso de 200 mg/dia de ITZ, em B após o aumento para 400 mg/dia, onde observamos a cura de algumas lesões o surgimento de outras como na figura C e o aumento novamente da dose para 600 mg/dia com regressão no tamanho das lesões em dois meses de tratamento caracterizando melhora do quadro clínico na figura D.

Os resultados demonstraram que não houve mudanças quanto perfil de sensibilidade ao ITZ e os outros antifúngicos avaliados, tanto para o CIM (**Tabela 12**) como para CFM (**Tabela 13**). As cepas isoladas permaneceram sensíveis para ITZ e resistentes para CAS, FLU e FCZ.

Tabela 10: Análise da função hepática e renal dos três pacientes com CBM que fizeram uso de 600 mg/dia.

Parâmetros	Paciente A	Paciente B	Paciente C
Hepáticos			
Bilirrubina Direta	0.24	0.25	0.25
Bilirrubina Indireta	0.68	0.51	0.34
Bilirrubina Total	0.92	0.76	0.59
TGO	23	22	15
TGP	22	28	28
GGT	38	16	13
ALP	82	62	17
Renais			
Creatinina	0.80	0.70	0.90
Uréia	19	30	39

Valores de Referência: Bilirrubina Direta (até 0.4 mg/dL); Bilirrubina Indireta (até 0.8 mg/dL); Bilirrubina Total (0.30 a 1.2 mg/dL); TGO (15 a 37 U/L); TGP (até 30 a 65 U/L); GGT (12 a 73 U/L); ALP (40 a 129 U/L); Creatinina (0.70 a 1.30 mg/dL) e Uréia (10 a 50 mg/dL).

Tabela 11: Característica dos três pacientes com resposta clínica positiva após o início do tratamento com 600 mg/dia de ITZ.

Paciente	Data do isolamento	Tratamento	Tempo de tratamento	Evolução Clínica
Paciente A				
A1	10/02/12	400 mg/dia	32 meses	Não Melhor
A2	05/10/12	600 mg/dia	2 meses	Melhor
Paciente B				
B1	27/01/12	400 mg/dia	42 meses	Não Melhor
B2	05/10/12	600 mg/dia	2 meses	Melhor
Paciente C				
C1	24/08/12	400 mg/dia	6 meses	Não Melhor
C2	05/10/12	600 mg/dia	2 meses	Melhor

Tabela 12: Avaliação da CIMs dos seis isolados clínicos de *F.pedrosoi*.

Isolados clínicos de <i>F. pedrosoi</i>	Concentração Inibitória Mínima (µg/ml)								
	ITZ	TBF	CTZ	ANF	5-FLU	FCZ	PCZ	VCZ	CAS
Paciente A									
A1	0.5	2	0.25	2	>64	64	0.25	0.25	16
A2	1	1	1	4	>64	>64	0.25	0.5	>16
Paciente B									
B1	0.5	1	0.5	4	>64	16	0.5	0.25	16
B2	0.5	2	0.5	4	>6	32	0.25	0.25	16
Paciente C									
C1	0.5	1	1	4	>64	64	0.25	0.25	16
C2	1	2	2	4	>64	>64	0.5	0.25	>16
MG	0.66	1.41	0.70	3.56	64	45.25	0.31	0.28	16

Segundo a norma M38-A2 os isolados são resistentes aos antifúngicos são quando a CIM para: ITZ, PCZ e VCZ ≥ 4 ; TBF ≥ 0.5 ; CTZ ≥ 0.5 ; ANF ≥ 2 ; 5-FLU e FCZ ≥ 64 e CAS ≥ 4 .

Tabela 13: Avaliação da CFM dos seis isolados clínicos de *F.pedrosoi*.

Isolados clínicos de <i>F. pedrosoi</i>	Concentração Fungicida Mínima ($\mu\text{g/ml}$)								
	ITZ	TBF	CTZ	ANF	5-FLU	FCZ	PCZ	VCZ	CAS
Paciente A									
A1	2	8	>16	>16	nd	nd	16	2	nd
A2	4	8	16	>16	nd	nd	8	8	nd
Paciente B									
B1	2	8	>16	>16	nd	>64	2	4	nd
B2	4	8	8	16	nd	>64	2	2	nd
Paciente C									
C1	2	>16	4	>16	nd	nd	8	2	nd
C2	4	>16	4	16	nd	nd	16	8	nd
MG	2.82	10	9	16	nd	nd	6.35	3.56	nd

Na figura 19, estão descritos os resultados da determinação do ITZ e ITZOH em dois momentos, antes e após o uso de 600 mg/dia. Na dose de 400 mg, as concentrações variaram de 215 a 243 ng/ml, com valor médio de 226 ± 14.9 ng/ml para o ITZ, enquanto que para o ITZOH as concentrações variaram de 519 a 783 ng/ml, com valor médio de 612 ± 148 ng/ml. Já na dose de 600 mg, variaram de 279 a 721 ng/ml para o ITZ, com valor médio de 448 ± 194 ng/ml, e 1034 a 1412 ng/ml para o ITZOH, com valor médio de 1.203 ± 192 ng/ml. A figura 20 ilustra a somatória das concentrações de ITZ e ITZOH para os três pacientes submetidos a uma mudança no esquema terapêutico.

Observando individualmente cada paciente podemos notar uma tendência de aumento para ITZ, mas quando comparamos a concentração média nos dois momentos não temos diferença estatística significativa ($p=0.1824$) (**Figura 21**). Por outro lado, quando avaliamos o

ITZOH observamos um aumento significativo nos níveis plasmáticos a partir do momento que eles começaram a utilizar a dose de 600 mg/dia ($p=0.0148$). (**Figura 22**)

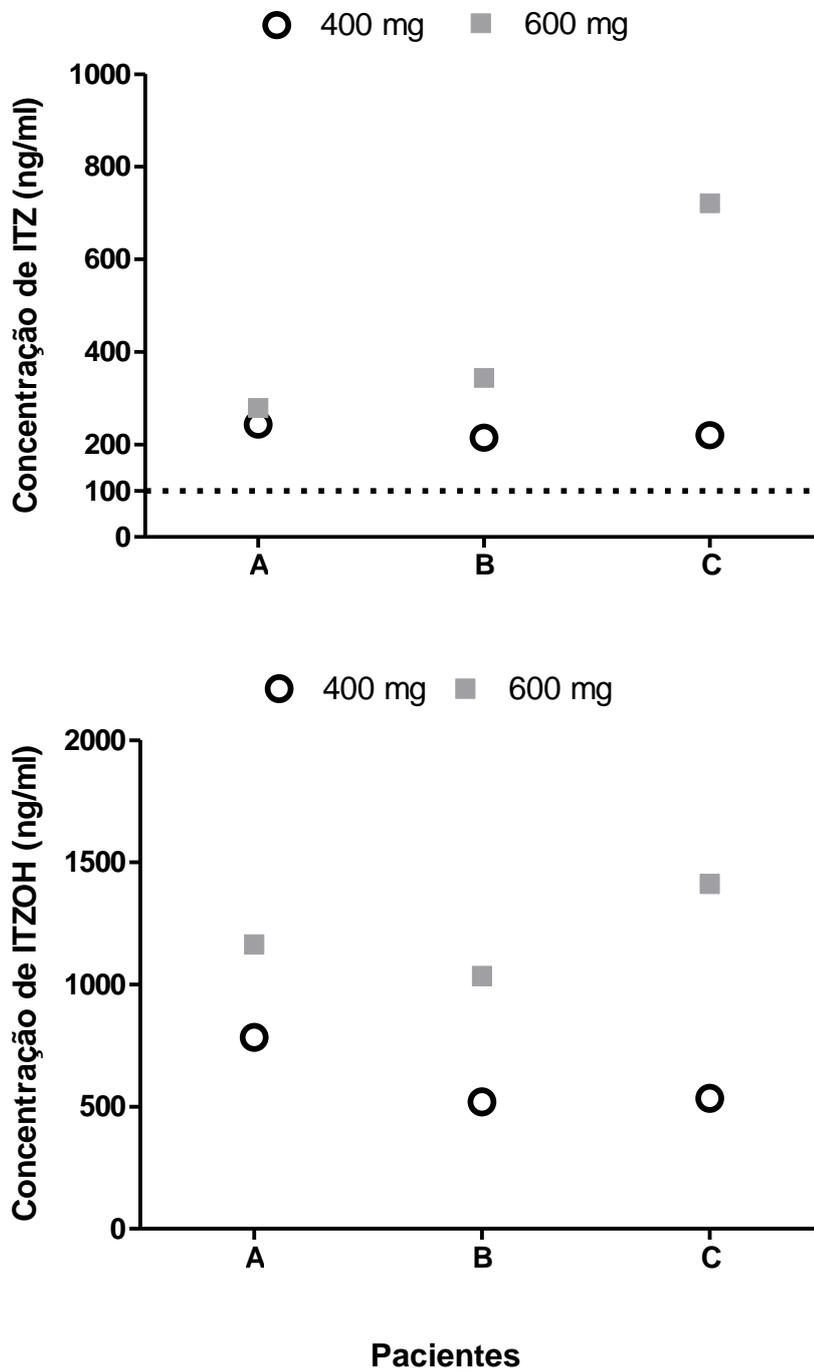


Figura 19: Concentrações plasmáticas de ITZ e de ITZOH antes e após o uso de 600 mg/dia.

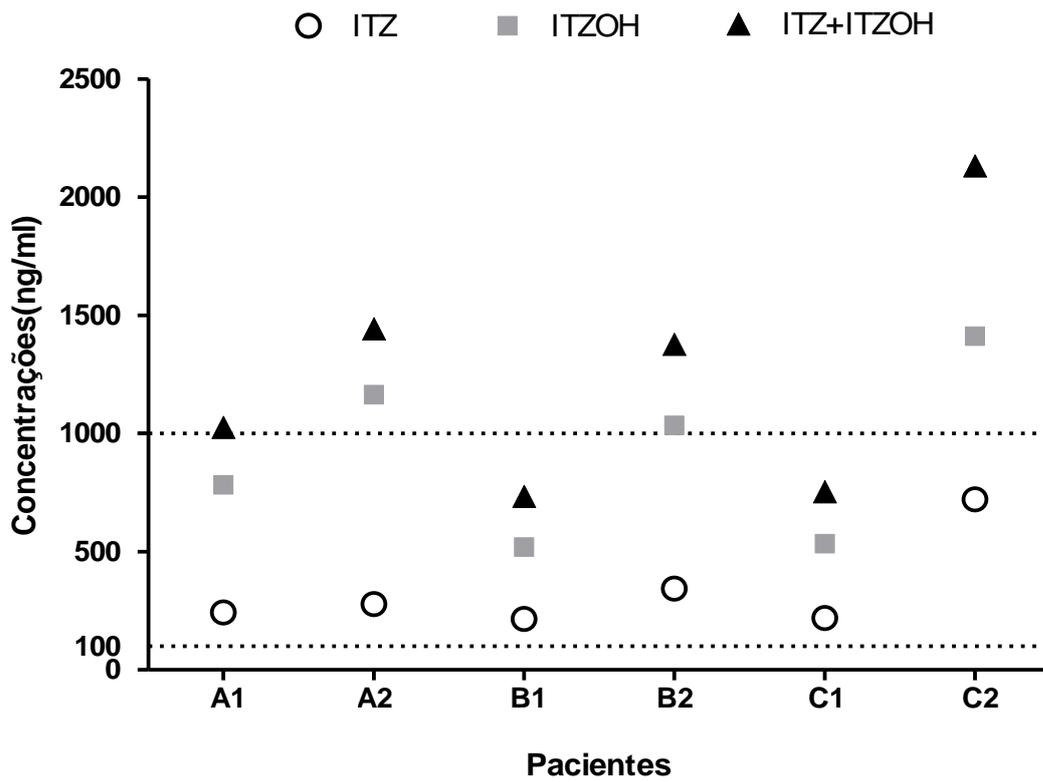


Figura 20: Somatória das concentrações de ITZ + ITZOH para os três pacientes submetidos a mudança no esquema terapêutico para 600 mg/dia.

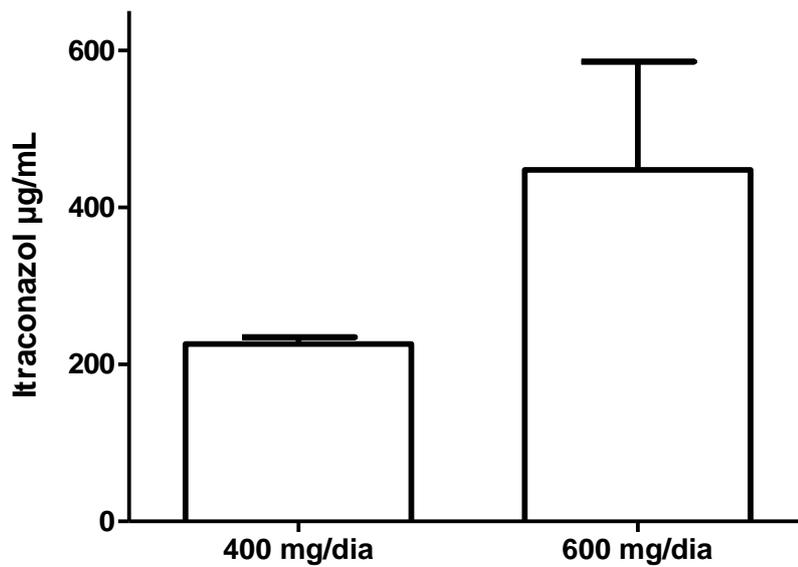


Figura 21: Níveis plasmáticos de ITZ em pacientes com CBM antes e após o aumento da dose para 600 mg/dia. Os dados demonstram que o ITZ apresentou um valor médio de 226 ± 14.9 ng/ml na dose de 400 e 448 ± 194 ng/ml na dose de 600 mg/dia. Os valores expressos em média \pm dp. $p > 0.05$ sem diferença estatística significativa.

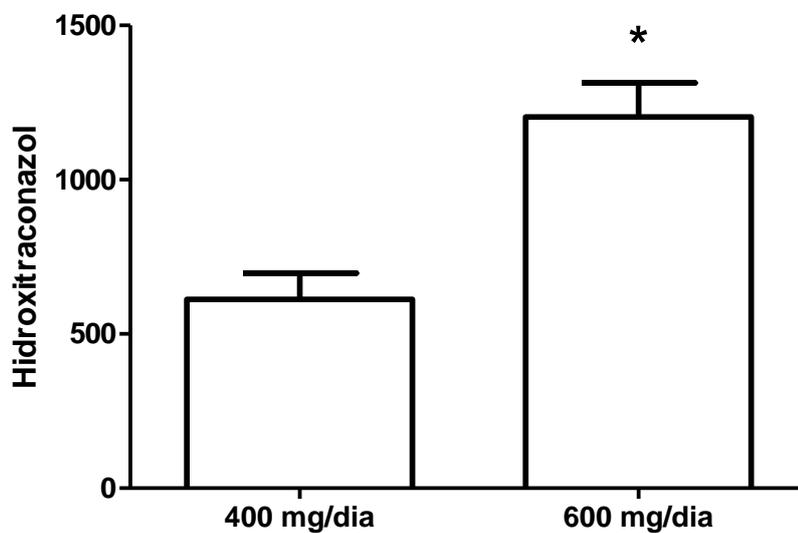


Figura 22: Níveis plasmáticos de ITZOH em pacientes com CBM antes e após o aumento da dose para 600 mg/dia. Os dados demonstram que o ITZOH apresentou um valor médio de 612 ± 148 ng/ml na dose de 400 e 1203 ± 156 ng/ml na dose de 600 mg/dia. Os valores expressos em média \pm dp. $*p < 0.05$ com diferença estatística significativa.

6. DISCUSSÃO

Apesar de alguns trabalhos terem abordado a questão da avaliação da sensibilidade *in vitro* dos agentes da CBM frente à diferentes antifúngicos (BEDOUT *et al.*, 1997; ANDRADE *et al.*, 2004; VITALE *et al.*, 2009; NAJAFZADEH *et al.*, 2010, BADALI *et al.*, 2010, YANG *et al.*, 2012, DABOIT *et al.*, 2013; DENG *et al.*, 2013), os dados são escassos, os resultados são controversos e ainda sem consenso. Além disso, é raro encontrar trabalhos avaliando a correlação do perfil de suscetibilidade aos antifúngicos com a evolução clínica, o tipo de lesão, distribuição geográfica e as diferentes espécies. E apesar do ITZ ser o medicamento mais utilizado na CBM, informações sobre os níveis plasmáticos efetivos deste fármaco e dos seus metabólitos circulantes necessários para profilaxia e tratamento ainda não estão definidos nesta patologia.

O presente estudo procurou caracterizar o perfil de sensibilidade dos isolados clínicos da CBM de pacientes procedentes de diferentes municípios do Pará e do Maranhão, atendidos na URE Marcello Candia, frente a nove agentes antifúngicos, acompanhando a evolução da doença ao longo do tratamento farmacológico com ITZ, possibilitando assim investigar uma relação entre os valores de CIM e CFM do ITZ com a resposta clínica, distribuição geográfica e tipo de lesão. Também foi realizado o monitoramento dos níveis plasmáticos de ITZ e ITZOH, buscando entender a farmacocinética deste medicamento nos pacientes com CBM, para otimização da terapêutica farmacológica.

Os resultados epidemiológicos demonstraram que a população acometida pela doença era formada por adultos do sexo masculino, agricultores, com idade média de 57.44 anos. Esta realidade pode ser decorrente das atividades rurais serem mais exercidas pelos homens e os traumatismos, que favorecem a implantação transcutânea do fungo, estarem associados à manipulação da vegetação rural (SILVA *et al.*, 1999; MARTINEZ & TOVAR, 2007; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2012). Em contraste, no Japão, onde as atividades agrícolas são

exercidas por ambos os sexos, a distribuição é próxima de 1:1 (KONDO, 2005). Os estudos de SALGADO *et al* (2004) e MARQUES *et al* (2006), fortalecem essa ideia, pois identificaram a presença natural do fungo *F. pedrosoi*, o principal causador da CBM, em regiões rurais do Estado do Pará e Maranhão.

Quanto à distribuição anatômica, o principal local afetado por lesão foi o membro inferior. Estudos epidemiológicos em outras regiões como São Paulo, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Sri Lanka e Madagascar descreveram um perfil semelhante ao encontrado em nosso estudo (ANDRADE *et al.*, 2004, MINOTTO *et al.*, 2001, MOUCHALOUAT *et al.*, 2011, ATAPATTU, 1997; ESTERRE *et al.*, 1996). Novamente, de modo distinto ao encontrado na maioria das regiões, os casos de CBM no Japão apresentam lesões nos membros superiores, cabeça e pescoço (KONDO, 2005), o que talvez possa ser explicado por diferentes modos de lidar com a agricultura.

Nossos dados locais sugerem que, pelo menos parte dos trabalhadores rurais não utilizam equipamentos de proteção individual (EPIs, botas e calças), o que favorece o contato direto com a vegetação onde o fungo é encontrado, e com o desenvolvimento de lesões (MOUCHALOUAT *et al.*, 2011; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011). Assim, esperamos que este estudo possa servir de base para novas diretrizes e políticas governamentais, buscando não somente o tratamento desses trabalhadores, mas aumentando as ações no campo da prevenção da doença, tais como medidas educativas que esclareçam a importância do uso EPIs e até mesmo o fornecimento desses equipamentos gratuitamente para pequenos agricultores.

A CBM é uma doença de difícil tratamento, em parte pela falta de padronização do esquema terapêutico (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2012), resultado da utilização de várias opções de tratamento, sempre com baixas taxas de cura e frequentes recidivas (MINOTTO *et al.*, 2001; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 1992). Diante desta realidade, os ensaios de

suscetibilidade *in vitro* vêm ganhando importância para detectar cepas resistentes, comparar eficácia de diferentes antifúngicos e direcionar a farmacoterapia.

No presente estudo os resultados de CIM demonstraram que três antifúngicos (PCZ, VCZ e ITZ) entre os nove estudados, apresentaram melhor atividade contra os isolados clínicos de *Fonsecaea spp*, corroborando com alguns dados da literatura, como de DABOIT *et al* (2013) que demonstraram que o ITZ, entre os avaliados, foi o segundo mais eficiente, enquanto que NAJAFZADEH *et al* (2010) e ROJAS *et al* (2015) usando o CIM como parâmetro, também determinaram o PCZ, ITZ e VCZ com os menores valores e consequentemente os mais eficientes *in vitro*, contra o principal agente causador da CBM. Além disso, outros estudos demonstraram que esses fármacos apresentaram um perfil de atividade *in vitro* similar contra *Cladophialophora carrionii*, outro agente causador da CBM (VITALLE *et al.*, 2009 ; DENG *et al.*, 2013).

Nos últimos anos o arsenal antifúngico foi ampliado com a inclusão de novos triazóis, como o VCZ e o PCZ, que vêm demonstrando eficácia em teste de sensibilidade *in vitro* e em consequência disso já estão sendo utilizados na terapia da CBM (NAJAFZADEH *et al.*, 2010; DENG *et al.*, 2013; DABOIT *et al.*, 2014), apesar do seu uso nesta doença ainda ser limitado devido ao alto custo (AMEEN, 2010; VITALE *et al.*, 2009). No presente estudo, o PCZ e o VCZ demonstraram ser os mais eficazes *in vitro*, pois apresentaram baixos valores de CIMs. Entretanto, o PCZ apresentou o menor valor de CFM, indicando que entre todos os nove fármacos é o que consegue eliminar o fungo na menor concentração. Esses dados sugerem que o PCZ pode ser uma opção de tratamento para pacientes com CBM que não respondem positivamente a terapia com ITZ.

O VCZ é um triazólico que apresenta um largo espectro de atividade antifúngica (CATALÁN e MONTEJO, 2006; MIKUS *et al.*, 2011), e alguns estudos *in vitro* mostraram que ele apresenta baixo CIM contra agentes causadores da CBM (VITALE *et al.*, 2009, DENG

et al., 2013, NAJAFZADEH *et al.*, 2010, BIANCALANA *et al.*, 2011, YANG *et al.*, 2012), concordando com os resultados observados em nosso estudo. Porém, nem todas as cepas são sensíveis a esse medicamento. DABOIT *et al.* (2014) avaliaram a suscetibilidade *in vitro* de 60 isolados clínicos de diferentes agentes causadores da CBM e observaram que esses isolados apresentavam elevada CIM para o VCZ (CIM = 2.639 µg/ml). Esses dados controversos reforçam a ideia de que os testes de sensibilidade *in vitro* devam ser realizados sempre antes do início terapia da CBM, para identificação de cepas sensíveis aos diferentes fármacos.

O grupo representado pelos antifúngicos TBF, CTZ, ANF e CAS demonstrou baixa atividade contra os isolados de clínicos de *Fonsecaea spp.* A TBF vem sendo cada vez mais utilizada no tratamento de doenças causadas por fungos demáceos, incluindo a CBM (ANDRADE *et al.*, 2004; BIANCALANA *et al.*, 2011; DABOIT *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2012; DENG *et al.*, 2013). No entanto, nosso trabalho indica que a TBF possui baixa efetividade contra os isolados clínicos de *Fonsecaea spp.*, com 92.7% de cepas resistentes (CIM \geq 0.5 µg/ml) para este fármaco. Adicionalmente, na avaliação da CFM, 53% dos isolados cresceram na maior concentração de 16 µg/ml, confirmando a baixa eficácia deste medicamento. Esses dados reforçam mais uma vez a importância do teste *in vitro*, e sugerem que o uso isolado da TBF deve ser avaliado com cautela em nossa região.

O CTZ e a ANF apresentaram altos valores de CIM e CFM, compatíveis com os dados da literatura (VITALE *et al.*, 2009; BEDOUT *et al.*, 1997; CALIGIORNE *et al.*, 1999; ANDRADE *et al.*, 2004). Atualmente, o CTZ não é utilizado na terapia da CBM devido à sua baixa eficiência e elevado risco de efeitos adversos em tratamentos mais longos, como é o caso da CBM (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009). Em relação à ANF, todos os isolados apresentaram resistência (\geq 2 µg/ml) confirmando que este fármaco não é considerado como uma boa escolha para terapia da CBM (BEDOUT *et al.*, 1997, ANDRADE *et al.*, 2004; BIANCALANA *et al.*, 2011; DABOIT *et al.*, 2014, BADALI *et al.*, 2010; THOMPSON *et al.*, 2009). Outro

antifúngico avaliado nesse grupo foi a CAS, representante da classe dos equinocandinas, que apresentou elevados valores de CIM e CFM, confirmando estudos anteriores que demonstraram ser um medicamento ineficaz na CBM (NAJAFZADEH *et al.*, 2010; BADALI *et al.*, 2010; DENG *et al.*, 2013). Nós também avaliamos o FCZ e FLU, e para esses antifúngicos encontramos 100% de resistência nos isolados clínicos, confirmando dados semelhantes obtidos por outros autores (NAJAFZADEH *et al.*, 2010; BADALI *et al.*, 2010; DENG *et al.*, 2013).

Em relação aos agentes etiológicos, há relatos de que a infecção causada pela espécie *F. pedrosoi* parece ser mais agressiva, enquanto que a *F. monophora* tem sido considerada como oportunista (ZHANG *et al.*, 2009, YANG *et al.*, 2012). Nosso estudo demonstrou que essas diferenças na patogenicidade provavelmente não se relacionam com a sensibilidade aos antifúngicos, pois as duas espécies apresentaram um perfil de sensibilidade semelhante. Os fármacos mais eficientes contra ambos os fungos foram o ITZ, VCZ e PCZ, porém sem diferença estatística entre essas espécies, indicando que apesar de importante para levantamento epidemiológico, a identificação da espécie não é primordial para iniciar o tratamento farmacológico, sendo, neste aspecto, mais relevante o teste de suscetibilidade *in vitro*. Além disso, é importante destacar que a espécie *F. pedrosoi* foi o principal causador da CBM em nosso estudo, com 72.72 % dos casos, confirmando dados da literatura que apontam esse fungo como o maior responsável pela CBM no Estado do Pará (SILVA *et al.*, 1999; PIRES *et al.*, 2012), mesmo antes da disponibilidade de genotipagem por biologia molecular, como aqui realizado.

Entre os antifúngicos avaliados em nosso estudo, o ITZ nos permitiu fazer, além da análise *in vitro*, uma relação com evolução clínica pois é o fármaco de escolha para tratamento da CBM na URE Marcello Candia. Estudos que relacionam a atividade de drogas antifúngicas *in vitro* com a resposta clínica vêm sendo realizados para algumas espécies de *Candida*

(MIKUS *et al.*, 2011), porém para CBM esses dados são escassos. Diante deste fato, em nosso estudo correlacionamos o CIM do ITZ com a evolução clínica.

Uma análise individual de cada paciente, demonstrou que todos os isolados clínicos apresentaram $CIM \leq 1 \mu\text{g/ml}$. De acordo com REVENKAR & SUTTON (2010) esse valor é um bom indicador de sensibilidade, com boas possibilidades de resposta positiva ao tratamento dos fungos melanizados, e segundo a norma M38-A2 podemos afirmar que não foram encontradas cepas resistentes ao ITZ. Apesar da ausência de resistência *in vitro* (também conhecida como resistência microbiológica), 13 % dos pacientes apresentaram uma piora do quadro clínico, o que também, de modo semelhante, foi descrito em pacientes com candidíase, onde 94 % das cepas foram inibidas em concentrações $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ de ANF e mesmo assim 60 % a 70 % apresentaram falha terapêutica (PFALLER *et al.*, 1996; ESPINEL-INGROFF, 2003).

Em nosso estudo, observamos que os isolados de clínicos de *Fonsecaea* spp não apresentaram resistência microbiológica, porém podemos inferir que estes pacientes que não apresentaram melhora possivelmente estejam com resistência clínica que é a persistência ou progressão de uma infecção apesar da administração de tratamento antifúngico adequado. Entre os principais fatores que contribuem para resistência clínica podemos destacar a farmacocinética do antifúngico, interações medicamentosas, idade, perfil imunológico do paciente, gravidade da doença e adesão do paciente a terapia (SANGLARD, 2003; WHITE *et al.*, 1998). Porém, apesar desses fatores, o valor de CIM ainda é importante para evolução da doença, pois no grupo de pacientes com piora a média do CIM foi de $0.9 \mu\text{g/ml}$, significativamente maior do que os pacientes com cura, melhora e sem melhora.

Diante desses resultados, podemos sugerir então que 1) em cepas consideradas não resistentes pela norma M38-A2, o grau de sensibilidade, mesmo com pequenas variações entre os valores de CIM, ainda pode influenciar a evolução clínica e; 2) mais estudos são necessários

para uma melhor definição do *cut-off* adequado para separar cepas sensíveis de cepas resistentes no que tange aos fungos negros causadores de CBM.

Sabe-se que o resultado terapêutico da CBM depende de vários fatores, entre eles destaca-se o tipo de lesão (BONIFAZ *et al.*, 2004; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 1992). SALGADO *et al* (2009) relataram a importância em conhecer os tipos de lesões da CBM, pois através da identificação correta é possível estabelecer melhor o prognóstico de cada paciente, como acontece por exemplo com as lesões anulares, que apresentam um tempo de tratamento em torno de 6 a 12 meses, enquanto que as lesões em placa, nodular e difusa variam de 9 meses a mais que 3 anos (SALGADO, 2013). Nossos resultados demonstraram que essas diferenças não estão relacionadas com a sensibilidade do fungo ao ITZ, pois não houve diferença significativa na CIM entre os isolados clínicos de *Fonsecaea spp* dos diferentes tipo de lesão, sugerindo que outros fatores estão relacionados a essa variação.

Outro fator determinante para avaliação da evolução clínica dos pacientes foi a quantificação das concentrações plasmáticas de ITZ e ITZOH. O ITZ, um dos poucos medicamentos disponíveis para o tratamento da CBM, apresenta marcada variabilidade farmacocinética inter e intra-individual, que pode comprometer a eficácia terapêutica, portanto, torna-se relevante a monitorização de suas concentrações, afim de garantir que sejam adequadas (BEGG *et al.*, 2001).

Em nosso estudo, observamos uma elevada variação interindividual nas concentrações plasmáticas de ITZ e ITZOH. Dados semelhantes foram descritos na literatura comparando a dose de 200 mg/dia administrada em duas formas farmacêuticas diferentes (cápsula e solução oral), ocasião em que foi observada uma larga variação intra e iterindividual nas concentrações plasmáticas em ambas as apresentações (BRADFORD *et al.*, 1991, FREMAN *et al.*, 2007). Tal fato pode ser justificado pela absorção variável, elevada lipossolubilidade, variabilidade na

biodisponibilidade do fármaco, alta ligação as proteínas plasmáticas (> 99 %), extensiva metabolização hepática e interações medicamentosas e com alimentos (BEULE, 1996).

Alguns autores recomendam que os níveis plasmáticos do ITZ sejam superiores a 100 ng/ml (CAUWENBERGH, 1994), e em nosso estudo observamos que 93% (14 pacientes) apresentavam níveis superiores a estes, o que indica uma adesão adequada ao tratamento pela maioria dos pacientes. Apesar de não estarem bem definidas as concentrações “ótimas” para o ITZOH, foi observado que este metabólito apresenta-se três vezes mais concentrado que o próprio ITZ, sendo importante destacar que o ITZOH é considerado metabólito ativo, podendo contribuir para atividade micológica do tratamento. Deste modo, essa diferença parece indicar uma importante contribuição do ITZOH na terapia antifúngica, conforme relatado anteriormente (POIRIER & CHEYMOL, 1998).

Deste modo, quando separamos os grupos, melhora e sem melhora, observamos que não houve diferença para o ITZ, enquanto que o ITZOH apresentou maior concentração no grupo com melhora, reforçando a importância do ITZOH na atividade farmacológica. Entretanto, apesar das dosagens plasmáticas predizerem as concentrações teciduais, não se sabe exatamente quanto deste metabólito pode chegar ao local da lesão, e se ele estaria em maior concentração que o próprio ITZ neste compartimento, pois acredita-se que ele tem menor capacidade de atravessar membranas biológicas, devido ser uma molécula hidrofílica (SEISHIMA *et al.*, 2004). Apesar dos poucos trabalhos buscando esclarecer essa questão, SEISHIMA *et al.*, 2004, demonstraram em um paciente com CBM concentrações mais elevadas do ITZ no tecido lesionado em comparação ao plasma. As concentrações de ITZ e ITZOH no local da lesão podem esclarecer o papel de cada molécula no tratamento da CBM, indicando a necessidade de mais estudos.

Apesar de alguns trabalhos avaliarem a farmacoterapia da CBM com ITZ em doses de 100, 200 e 400 mg/dia, muitos pacientes não evoluem positivamente nessas dosagens, fato este

que demanda pela busca de novas alternativas terapêuticas, como por exemplo o aumento da dose diária utilizada por cada paciente. Porém, na CBM não existe relato na literatura do uso de doses superiores a 400 mg/dia, apesar de serem comumente usadas com sucesso em outras micoses sistêmicas (BONIFAZ *et al.*, 2004; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 1992; UNGAKORN & REANGCHAINAM, 2006, SHARKEY *et al.*, 1991, HUET *et al.*, 2008).

No presente estudo identificamos três pacientes que não apresentaram uma evolução favorável com o tratamento convencional (200 e 400 mg/dia de ITZ), apesar do tempo prolongado de tratamento. Então, estes pacientes foram submetidos a uma mudança no esquema terapêutico para 600 mg/dia, divididos em duas administrações ao dia. Nossos resultados mostraram que essa dosagem foi capaz de aumentar os níveis plasmáticos do ITZ e do ITZOH. É importante destacar que os três pacientes eram idosos, e que por esse motivo podem ter inclusive uma diminuição de sua taxa de absorção do medicamento (WILLEMS *et al.*, 2001), mas apesar deste agravante observamos um resultado satisfatório para os três, onde podemos destacar o paciente C, que apresentou uma concentração plasmática três vezes maior do que quando fazia uso de 400 mg/dia. É importante ressaltar que, mesmo com o aumento da dosagem e conseqüente aumento dos níveis plasmáticos, não observamos alterações significativas das funções hepáticas e renais, o que está de acordo com estudos anteriores realizados com esta dosagem em pacientes com candidíase (SHARKEY *et al.*, 1991).

A elevação do nível plasmático do medicamento indicava que poderíamos ter sucesso com o novo esquema terapêutico, o que foi confirmado pela rápida evolução clínica observada nesses pacientes. Em pouco tempo (2 meses) obtivemos melhora significativa das lesões nos três pacientes. Além disso, também acompanhamos o perfil de suscetibilidade dos isolados antes e depois do novo esquema terapêutico, e nossos dados demonstraram que não houve mudanças significativas nos valores de CIM e CFM para todos os nove fármacos. Esses

resultados indicam que o uso de doses elevadas de ITZ pode ser uma alternativa em pacientes com CBM sem resposta ao tratamento usual.

Devido à falta de um tratamento padronizado até o momento para a CBM, os testes de suscetibilidade desempenham um papel fundamental para a compreensão do perfil dos isolados de diferentes agentes da CBM. Desta forma, o presente estudo traz informações importantes, contribuindo para uma triagem de isolados resistentes ou não aos fármacos avaliados. Além disso, nossos dados sobre sensibilidade aos fármacos podem orientar o clínico para a escolha correta da terapia, mudança no esquema terapêutico, aumento da dose do fármaco ou troca do antifúngico por outro que seja mais efetivo.

7. CONCLUSÕES

1. O perfil epidemiológico dos pacientes acometidos pela CBM era formado por adultos do sexo masculino que desenvolviam atividades agrícolas.
2. Os dados de biologia molecular confirmaram que a principal espécie causadora de CBM no Estado do Pará é *F. pedrosoi* (73%), seguida por *F. monophora*.
3. Não houve correlação entre os tipos clínicos de lesões, as espécies encontradas e a sensibilidade dos isolados ao ITZ.
4. Nos testes de suscetibilidade *in vitro*, os fármacos com maior capacidade inibitória do crescimento fúngico foram: PCZ, VCZ e ITZ.
5. O PCZ apresentou a menor CFM, e pode ser uma alternativa terapêutica em pacientes que não respondem bem ao ITZ.
6. Nos testes de suscetibilidade *in vitro*, os antifúngicos ANF-B, FCZ, 5-FLU e CAS se demonstraram incapazes de inibir o crescimento dos fungos causadores da CBM.
7. Houve correlação entre as concentrações plasmáticas do metabólito ativo ITZOH e a evolução clínica dos pacientes.
8. Na determinação das concentrações plasmáticas, o metabólito ativo ITZOH apresentou concentrações até três vezes maiores que o ITZ, o que pode contribuir para atividade antifúngica do fármaco ITZ e assim auxiliar na resposta clínica do tratamento.
9. O uso de 600 mg/dia de ITZ pode ser uma alternativa terapêutica importante para pacientes que não estejam evoluindo satisfatoriamente com 400 mg/dia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMEEN, M. Chromoblastomycosis: clinical presentation and management. *Clin Exp Dermatol*, v.34, p.849-854, 2009.

ATTAPATTU, M.C. Chromoblastomycosis – a clinical and Mycological study of 71 cases from Sri Lanka. *Mycopathologia*, v.137, p.145-151, 1997.

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.

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.

AL DOORY. Chromomycosis. Mountain Press Publishing Company, Misoula, Mout, 1972.

ANDRADE, T. S., CURY, A. E., CASTRO, L. G. M. et al. Rapid identification of *Fonsecaea* by duplex polymerase chain reaction in isolates from patients with chromoblastomycosis. *Diagn Microbiol Infec Dis*, v. 57, p. 267-272, 2007.

BADALI, H., DE HOOG, G. S., CURFS-BREUKER, I. et al. Use of amplified fragment length polymorphism to identify 42 *Cladophialophora* strains related to cerebral phaeohyphomycosis with in vitro antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol*, v. 48, p. 2350-2356, 2010.

BANKS, I.S. Chromoblastomycosis in Zaire. *Int. J. Dermatol*, v.24, p. 302-307, 1985.

BERGER, L., BEAUDRY, M., GAUMOND, E. Chromoblastomycosis due to a New Species of fungus: (First Canadian Case). *Can Med Assoc J*, v. 53, p. 138- 145, 1945.

BHAKTAVIZIAM, C., SHAFI, M., MEHTA, M.C et al. Chromoblastomycosis. Report of a case from Tripoli, Libya. *Mycopathologia*, v. 82, p. 111-113, 1983.

BEULE, D.K. Itraconazole: pharmacology , clinical experience and future development. *Int J Antimicrob Agents*, v.6, p. 175-178, 1996.

BEDOUT, C., GÓMEZ, B. L., RESTREPO, A. *In vitro* susceptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 39, p. 145-148, 1997.

BEGG, E. J., BARCLAY, M.L., KIRKPATRICK, C.M. The therapeutic monitoring of antimicrobial agents. *Br J Clin Pharmacol*, v. 52, p. 35S-43S, 2001.

BIANCALANA, F. S., LYRA, L., SCHREIBER, A. Z. *In vitro* evaluation of the type of interaction obtained by the combination of terbinafine and itraconazole, voriconazole or amphotericin B against dematiaceous molds. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, v. 55, p. 4485-4887, 2011.

BURSTEIN, Z. Cromomicosis: clinica y tratamiento; situación epidemiológica en latinoamérica, v. 21, p. 167-175, 2004.

BONIFAZ, A., MARTÍNEZ-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.

BONIFAZ, A., CARRASCO-GERARD, E., SAUL, A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* v.44, p.1-7, 2001.

BONIFAZ, A., PAREDES-SOLÍS, V., SAÚL, A. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. *Expert Opin Pharmacother*, v.5, p.247-254, 2004.

BONIFAZ, A., SAÚL, A., PAREDES-SOLÍS, V. et al. Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine: experience with four cases. *J Dermatolog Treat*, v.16, p.47-51, 2005.

BRADFORD, C. R; PRENTICE, A. G; WARMOCK, D.W. Comparison of the multiple dose pharmacokinetics of two formulations of itraconazole during remission induction for acute myeloblastic leukaemia. *J Antimicrob Chemother*, v.28, p. 555-560, 1991.

CARRION, A. L. Chromoblastomycosis. *Ann N Y Acad Sci* , v.50, 1255. 1950.

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.

CATALÁN, M., MONTEJO, J. C., Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Rev Iberoam Micol*, v. 23, p. 39-49, 2006.

CASTRO, L. G. Chromomycosis: a therapeutic challenge. *Clin Infect Dis*, v.15, p. 553-554, 1992.

CALERO, C. Chromoblastomycosis in Panama; report of a new case and a new clinical form. *Arch Derm Syphilol*, v. 57, p. 266-271, 1948.

CAUWENBERGH, G. Pharmacokinetics of itraconazole. *Mycoses*, v.37, p.27-33, 1994.

CUENCA-ESTRELLA, M., LEE-YANG W, CIBLAK M.A. et al., Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, p 3644-3647, 2002.

CUNHA, M.M., FRANZEN, A.J., ALVINO, 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.

CUNHA, M.M., FRANZEN, A.J., SEABRA, S.H. et al. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BCM. Microbiol.* v.10, p.80, 2010.

CORREIA, R.T.M., VALENTE, N.Y.S, CRIADO, P.R. et al. Cromoblastomomicose: relato de 27 casos e revisão da literatura. *An Bras Dermatol*, v. 85, p. 448-454, 2010.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 2nd edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Approved Standard M 38-A2.

DABOIT, T.C., MAGAGNIN, C.M., HEIDRICH, D. et al. A case of relapsed chromoblatomycosis due to *Fonsecaea monophora*: antifungal susceptibility and phylogenetic analysis. *Mycopatologia*, v. 176, p. 139-144, 2013.

DABOIT, T.C., MAGAGNIN, C.M., HEIDRICH, D. et al. In vitro of chromoblatomycosis agents to five antifungal drug and to the combination of terbinaline and amphotericin B. *Mycoses*, v.57, p. 116-12, 2014.

DENG, S., de HOOG, G. S., BADALI, H. et al. In vitro antifungal suscetibility of *Cladophialophora carrionii*, and agent of human chromoblatomycosis. . *Antimicrob Agents Chemother*, v. 57, p. 1974-1977, 2013.

DE BONA, E., CANTON, L.M., MENEGHELLO FUENTEFRIA, A. Chromoblastomycosis in Santa Catarina state, Brazil. *Rev Cubana Med Trop*. v. 62, p. 254-256, 2010.

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, 1996.

ESPINEL-INGROFF, A. Utility of mould susceptibility testing. *Curr Opin Infect Dis*, v. 16, p.527-532, 2003.

FUKUSHIRO, R. Chromomycosis in japan. *Int J Dermatol*, v.22, p. 221-229, 1983.

FREEMAN, J., HESHMATI, A., HOLLAND, D. et al. Marked increase in steady-state serum levels achieved with itraconazole oral solution compared with capsule formulation. *J Antimicrob Chemother*, v. 60, p.908-909, 2007.

GUPTA, A. K., TABORDA, P. R., SANZOVO, A. D. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brasil, *Med Mycol*, v. 40, p. 529-534, 2002.

GUBBINS, P. O; GURLEY, B. J; BOWMAN, J. Rapid and sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of itraconazole and its hydroxy-metabolite in human serum. *J Pharm Biomed Anal*, v. 16. p. 1005 -1012, 1998.

HUET, E., HADJI, C., HULIN, A. et al. Therapeutic monitoring is necessary for the association itraconazole and efavirenz in a patient with AIDS and disseminated histoplasmosis. *AIDS*, v. 22, p. 1885-1896, 2008.

IBRAHIM-GRANET, 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.

JAYALAKSHMI, P., LOOI, L. M., SOO-HOO, T. S. Chromoblastomycosis in Malaysia. *mycopathologia*, 109, p. 27- 31, 1990.

KONDO, M; HIRUMA, M; NISHIOKA, Y. et al. A case of chromomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* and a review of reported cases of dematiaceous fungal infection in Japan. *Mycoses*, v. 48, p. 221 - 226, 2005.

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, 2002.

LESLIE, D. F., BEARDMORE, G. L. Chromoblastomycosis in Queensland: a retrospective study of 13 cases at the Royal Brisbane Hospital. *Australas J Dermatol*, v.20, p.23 - 30, 1979.

LE GALL, F., LULIN, J., COUTATARMANAC'H, A. et al. Une parasitose cutanée rarement observée en France: la chromomycose. *Ann Pathol*, v.13, p. 123 -127,1993.

LOPEZ, M. R. & MENDEZ TOVAR, L. J. Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol*,v.25, p.188-194, 2007.

LEÃO, R. N. Q. *Medicina Tropical e Infectologia na Amazônia*. Belém: Samauma Editorial, 2013.

LYON, J.P., SILVA AZEVEDO, M. P. C., MOREIRA, M.L. et al. Photodynamic antifungal therapy against chromoblastomycosis. *Mycopathologia*, v. 171, p. 293-297, 2011.

LUPI, O., TYRING, S. K., MCGINNIS, M. R. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. *J Am Acad Dermatol*. v.53, p.931-51, quiz, 2005.

MACOLA, S., RODRIGUEZ, D.P., FONT, E. et al. Cromomicosis: hongos dematiaceos que intervienen en su etiologia. *Rev Cubana Med*, v.36, p.136-14,1984.

MALKINA, A. Y, DARCHENKOVA, N. N. Distribution of chromoblastomycosis in the world. *Vestn Dermatol venerol*,v.1 ,p. 41 - 45,1977.

MAGALHÃES, M.J.C. & MEYER, H.A. Ten cases of chromoblastomycosis in Mozambique. First South African International Congress of Dermatology, Johannesburg, 1970.

MATTE, S.M., W, LOPES, J.O., MELO, I.S. et al. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul : Relato de 12 casos. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 30, p. 309-311,1997.

MATTÊDE, M.G.S., JUNIOR, L.P, COELHO, C.C.et al. Dermatite verrucosa cromoparasitária (cromomicose) Investigação de casos no Esatado do Espírito Santos. *An Bras Dermatol*, v. 65, p.70 - 74, 1990.

MARTINEZ, R. L., TOVAR, L. J. M. Chromoblastomycosis. *Clinics in Dermatology*, v.25, p.188 -194, 2007.

MARQUES, S. G., SILVA, C. M. P., SALDANHA, P. C. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the Shell of the babassu Coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon Region of Maranhão Brasil. *Jpn J Med Mycol*, v. 47, p. 305 - 311, 2006.

MENDOZA, L., KARUPPAYIL, S. M., SZANISZLO, P. J. Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi. *Mycoses*, v.36, p.157-164, 1993.

MINOTTO, R., BERNARDI, C. D. V., MALLMANN, L. P. et al. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *J Am. Acad Dermatol*, v. 44, p. 585 - 592, 2001.

Mc GINNIS, M. R. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis and mycology. *J Am Acad Dermatol*, v.8, p.1-16, 1983.

MOUCHALOUAT, M. F., GUTIERREZ GALHARDO, M. C., ZANCOPÉ-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.

MIKUS, G., SCHOLZ, I. M., WEISS, J. Pharmacogenomics of the triazole antifungal agent voriconazole. *Pharmacogenomics*, v. 12, p. 861-872, 2011.

NAJAFZADEH, M. J., BADALI, H., XI, L. et al. Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. *Med Mycol*, v. 47, p. 17-26, 2008.

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, 2010.

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, 2010.

NOSANCHUK, J.D., CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol*, v.5, p.203-223, 2003.

ODDÓ, D., LOBOS, T. Unusual mycoses in Chile: a report of 10 cases. *Rev Med Chil*. v. 116, p. 1135-1142, 1988.

PFALLER, M. A., MESSER, S.A., BOLMSTROM, A. et al. Multisite reproducibility of the Etest MIC method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol*, v. 34, p. 1691-1693, 1996.

PRADINAUD, R. Treatment of 6 chromomycoses by 5 fluoro-cytosine in French Guyana. *Nouv Presse Med*, v. 21, p.31, 1955.

PIRES, C.A.A, QUARESMA, J.A.S, SOUSA, B.R.M. et al. Clinical, epidemiological and mycological report on 65 patients from the Eastern Amazon region with chromoblastomycosis. *An Bras Dermatol*, v. 87, p55-60, 2012.

POIRIER, J. M., CHEYMOL, G. Optimisation of itraconazole therapy using target drug concentrations. *Clin Pharmacokinet*, v.35, p. 461 - 473, 1998.

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.

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.

QUEIROZ-TELLES, F., MC GINNIS, M. R., SALKIN, I. et al. Subcutaneous mycoses. *Infect Dis Clin North Am*, v.17, p.59-85, 2003.

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.

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.

RAJENDRAN, C., MISRA, R. S., KANDHARI, S. et al. Chromoblastomycosis in India. *Int J Dermatol*, v. 36, p. 29-33, 1997.

REVANKAR, S. G., SUTTON, D. A. et al. Melanized fungi in human disease. *Clin Microbiol Rev*, v. 23, p. 884-912, 2010.

RESTREPO, A; GONZALEZ, A, GOMEZ, I., ARANGO, M., BEDOUT, C. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole. *Ann N Y Acad Sci*, v. 544, p.504 - 516, 1988.

RIBEIRO, E. L., SOARES, A. J., FERREIRA, et al. Cromoblastomicose: Doença presente na realidade populacional brasileira. *RBAC*, v. 38, p. 189 -192, 2006.

RIVITTI, E. A., AOKI, V. Deep fungal infections in tropical countries. *Clin Dermatol*, v. 17, p. 171-190, 1999.

RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycology*. v. 42, p. 265-270. 1950.

RUDOLPH, M. Uber die brasilianische Figueira (Vorläufige Mitteilung). *Archiv Schiffs und Tropen-Hyg*, v.18, p. 498-499, 1914.

ROJAS, C. O., LEÓN- CACHÓN, R.B.R, ALÍ PÉREZ-MAYA, A. et al. Phenotypic and molecular identification of *Fonsecaea pedrosoi* strains isolated from chromoblastomycosis patients in Mexico and Venezuela. *Mycoses*, v.1, p.1-6, 2015.

SAAG, M. S., DISMUKES, W. E. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrob Agents Chemother*, v.32, p.1-8, 1988.

SALGADO C. G., SILVA, J. P., DINIZ, J. A. P. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 46, p. 33-36, 2004.

SALGADO, C. G., SILVA, J. P., SILVA, M. B. et al. Cutaneous diffuse chromoblastomycosis. *Lancet Infect Dis*, v.5, p.528, 2005.

SALGADO, C. G., SILVA, M. B., YAMANO, S. S. et al. Cutaneous localized annular chromoblastomycosis. *J Cutan Pathol*, v.36, p.257-261, 2009.

SALGADO, C. G. CROMOBLASTOMICOSE. In: LEÃO, RNQ. (Org.). *Medicina Tropical e Infectologia na Amazônia*. 1. ed. Belém: Samauma editorial, 2013.

SANGLARD, D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm Infecc Microbiol clin*, v. 20, p.462-470, 2002.

SHARKEY, P. K.; RINALDI, M. G.; DUNN, J. F. et al. High-dose itraconazole in the treatment of severe mycoses. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 35, p. 707-713, 1991.

SEISHIMA, M; OYAMA. Z; ODA. M. et al. Distribution of an antifungal drug, itraconazole, in pathological and non-pathological tissues. *Eur j Dermatol* , v.14, p. 24-27, 2004.

SILVA, C. M., ROCHA, R. M., MORENO, J. S. et al. The coconut babaçu (*Orbignya phalerata* martins) as a probable risk of human infection by the agent of chromoblastomycosis in the State of Maranhão, Brazil. *Rev Soc bras Med trop*, v. 28, p. 49-52, 1995.

SILVA J. P; DE SOUZA, W; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia*, v. 143, p. 171-176. 1999.

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.

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.

SONCK, C.E. Chromoblastomycosis: five cases from Finland. *Acta Dermato-Venereologica*, v. 39, p. 300-309, 1959.

TALHARI, S., ALCIDARTA, G.R., CUNHA, M.G.S et al. Deep mycosis in Amazonia-study of diagnosed cases in Manaus – Amazonas State. *Na bras Dermatol*. v. 55, p. 133-136, 1980.

TORRES-GUERRERO, E., ISA-ISA, R., ISA, M. et al. Chromoblastomycosis. *Clin in Dermatology*, v.30, p. 403-408, 2012.

THOMPSON, G. R., CADENA, J., PATTERSON, T.F. Overview of Antifungal Agents *Clin Chest Med*, v.30, p.203-215, 2009.

UNGPAKORN, R., REANGCHAINAM, S. Pulse itraconazole 400 mg daily in the treatment of chromoblastomycosis. *Clin Exp Dermatol*, v. 31, p. 245 - 247, 2006.

VELASQUEZ, L. F, RESTREPO, A., CALLE, G. Chromomycosis: experiencia de doce anos. *Acta Medica Colombiana*,v.1, p.165-171, 1976.

VIGNALE, B., MONTERO, E.D., TOST J.F. et al. Chromoblastomycosis; second case reported in Uruguay. *An Fac Med Univ Repub Montev Urug*, v. 40, p.87-92, 1955.

VITALE, R. G., PEREZ-BLANCO, M., DE HOOG, G. S. *In vitro* activity of antifungal drug against *Cladophialophora* species associated with human chromoblastomycosis. *Med Mycol*, v. 47, p. 35-40, 2009.

WALTER, P; GARIN, Y; RICHARD-LENOBLE, D. Chromoblastomycosis, a morphological of the host-parasite interaction. *Virchows Archives*, v. 397, p. 203-214, 1982.

WILLEMS, L.; VAN DER GEEST, R.; DE BEULE, K. Itraconazole oral solution and intravenous formulations: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Journal Clinical Pharmacy and Therapeutics*, v. 26, p. 159-169, 2001.

WHITE, T. C., MARR, K. A., BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*, v. 11, p. 382 - 402, 1998.

XI, L., SUN, J., LU, C. et al. Molecular diversity of *Fonsecaea* (Chaetothyriales) causing chromoblastomycosis in southern China. *Med Mycol*, v. 47, p. 27-33, 2009.

YANG, Y. P., HUANG, Y. Z., ZHOU. et al. Chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea*: clinicopathology, susceptibility and molecular identification of seven consecutive cases in southern China. *Clin Microbiol Infect*, v.19, p. 1023-1028, 2012.

YEGRES, F. Cromomicosis por *Cladosporium carrionii* em criadores de caprinos Del Estado Falcon. *Investigacion Clinica*, v.26, p.235-246,1985.

ZHANG, J.M., XI, LY., ZHANG, H . et al., Synergistic effects of terbinafine and itraconazole on clinical isolates of *Fonseceae monophora*. *Eur J Dermatol*. v. 19, p. 451-455, 2009.

ZEPPENFELDT, G; RICHARD-YEGRES, N; YEGRES, F. *Cladosporium carrionii*: hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomicosis en Venezuela. *Rev. iberoamer. Micol.*, p. 61 - 63, 1994.