



Universidade Federal do Pará - UFPA  
Instituto de Ciências Biológicas - ICB  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

ALINE BARRAL TAKAHASHI

Avaliação *in vitro* da suscetibilidade antifúngica de conídios e células  
muriformes de *Fonsecaea* spp

BELÉM  
2018

ALINE BARRAL TAKAHASHI

**Avaliação *in vitro* da suscetibilidade antifúngica de conídios e células muriformes  
de *Fonsecaea* spp**

Dissertação de Mestrado apresentada 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 mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado.  
Co-orientador: Prof. Dr. Moises Batista da Silva.

BELÉM  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pela autora

---

BARRAL TAKAHASHI, ALINE

Avaliação in vitro da suscetibilidade antifúngica de conídios e células muriformes de  
*Fonsecaea* spp / ALINE BARRAL TAKAHASHI. — 2018  
52 f. : il. color

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular  
(PPGNBC), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Claudio Guedes

Salgado Coorientação: Prof. Dr.

Moises Batista da Silva.

1. Cromoblastomicose. 2. *Fonsecaea* spp. 3. antifúngicos. I. Salgado, Claudio Guedes , *orient.* II.  
Título

---

CDD 616.9041

ALINE BARRAL TAKAHASHI

**Avaliação *in vitro* da suscetibilidade antifúngica de conidíos e células muriformes  
de *Fonsecaea* spp**

Defesa de dissertação de mestrado apresentada 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 mestre em Neurociência e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado

Co-orientador: Prof. Dr. Moises Batista da Silva

Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - Universidade Federal do Pará – UFPA.

Banca examinadora:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

BELÉM  
2018

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo alimento e força espiritual para subir cada degrau desta jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Salgado, pelo convite de ir ao Laboratório de DermatoImunologia, em meados de 2012, e me permitir conhecer a pesquisa e que mesmo insegura com o novo aceitei o desafio de por em pratica os conhecimentos da biologia, minha formação de base.

Ao Professor Moises Silva, pela dedicação, pelo apoio nos momentos de desespero de experimentos rsrs, pela paciência e todo o aprendizado nesses últimos anos.

À professora Patrícia Fagundes, meu obrigada pelas sugestões e contribuição nas minhas dúvidas sempre que possível.

A família LDI, como costume chamar, Naila e Sâmela (o grupo barulhento dos fungos rs), as “meninas da MH” Angélica, Ana, Raquel e Erika obrigada pela parceria em todos os sentidos. À Dani Paternostro, pelo auxilio, dicas e pelo aprendizado enquanto eu era IC do lab., às ICs e aos técnicos obrigada pela ajuda sempre que solicitei.

À minha Vó Edna Barral e Vô Barral (*in memorian*) na qual estariam orgulhosos, obrigada por todo amor e dedicação pela minha formação pessoal.

Aos Meus Pais e Irmão, obrigada pela compreensão e apoio ao longo desta jornada.

À família Barral, tias, primos e primas, caminhamos juntos na minha formação.

Ao meu esposo Rodrigo Takahashi, por estar sempre comigo, me apoiando e acreditar junto comigo que este sonho seria possível.

À família Takahashi, à Vó Haru, meus sogros, cunhadas, cunhado, tias, por acreditarem em mim, pelo apoio e compreensão.

Aos órgãos de fomento deste estudo e as instituições parceira de nosso laboratório.

A todos, meu muito obrigada.

À todas as pessoas que possam propagar o conhecimento e estejam sempre em busca de uma resposta de cura para esta doença

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
1.1. CROMOBLASTOMICOSE .....	10
1.2. AGENTES ETIOLÓGICOS .....	12
1.3. ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO.....	15
1.4. TRATAMENTO .....	17
1.5. FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS .....	18
1.6. TESTES DE SENSIBILIDADE <i>in vitro</i> A AZÓLICOS.....	22
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. GERAL.....	25
2.2. ESPECÍFICOS .....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
3.1. AMOSTRAS FÚNGICAS .....	26
3.2. TESTE DE SUSCETIBILIDADE <i>in vitro</i> A ANTIFÚNGICOS .....	27
3.2.1. Preparação dos fármacos antifúngicos.....	27
3.2.2. Preparo da suspensão de conídios.....	27
3.2.3. Obtenção e preparo da suspensão de células muriformes.....	28
3.2.4. Interação de antifúngicos x conídios ou células muriformes.....	28
3.2.5. Determinação da CIM.....	29
3.2.6. Determinação da CFM.....	29
3.2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4.1. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MURIFORMES <i>in vitro</i> .....	31
4.2. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	32
4.3. SENSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> .....	34
4.3.1. Concentração inibitória mínima .....	34
4.3.2. Concentração fungicida mínima.....	39
5. CONCLUSÕES.....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

## RESUMO

A cromoblastomicose (CBM) é uma doença fúngica caracterizada por lesões crônicas cutâneas e subcutâneas, decorrentes da implantação transcutânea prévia de diferentes fungos negros, pertencentes a família Herpotrichiellaceae, o principal agente pertencente ao gênero *Fonsecaea*. A região amazônica é a principal área endêmica do Brasil, o estado do Pará a principal área endêmica no país e segunda no mundo. Não há uma padronização de tratamento, é usado a terapia medicamentosa, com diferentes esquemas, principalmente itraconazol. Novos azólicos como posaconazol e voriconazol começaram a ser utilizados, mas com limitações devido ao alto custo, o uso de métodos físicos como a criocirurgia, termoterapia, terapia a laser e a combinação de ambos. As baixas taxas de cura e altas taxas de recidivas da doença pode estar relacionado aos diferentes métodos de tratamento empregados e a própria falta de um esquema padronizado. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade *in vitro* de conídios e células muriformes, induzidas *in vitro*, de *Fonsecaea* spp. frente a diferentes antifúngicos, até o momento não há estudos que avaliem a ação de fármacos usando a forma patogênica do fungo, reforçando a importância deste estudo, seguindo o método estabelecido na norma M38-A2, do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A concentração inibitória mínima para cada fármaco utilizado foi obtida após 5 dias de interação, o posaconazol apresentou melhor atividade inibitória *in vitro* para conídios (CIM<sub>MG</sub>=0.632µg/ml) e células muriformes (CIM<sub>MG</sub>=1µg/ml). Na análise da concentração fungicida, tanto em conídios quanto em células muriformes, o posaconazol apresentou menor valor (CFM<sub>MG</sub>=6.72µg/ml, em ambos). As amostras fúngicas apresentaram tempos distintos para diferenciar seus conídios em células muriformes, portanto acreditamos que apesar de pertencerem ao mesmo gênero os fungos apresentam particularidades fisiológicas ainda desconhecidas. Nos testes de suscetibilidade *in vitro*, o PCZ teve as menores concentrações inibitórias e fungicidas tanto em conídios quanto em células muriformes, com isso investir em testes de suscetibilidade foi impor importante para identificar cepas sensíveis ou resistente

Palavras-chaves: cromoblastomicose, *Fonsecaea* spp, antifúngicos.

## ABSTRACT

Chromoblastomycosis (CBM) is a fungal disease characterized by chronic cutaneous and subcutaneous lesions, due to the previous transcutaneous implantation of different black fungi, belonging to the family Herpotrichiellaceae, the main agent belonging to the genus *Fonsecaea*. The Amazon region is the main endemic area of Brazil and our state is the main endemic area in the country and second in the world. There is no standardization of treatment, drug therapy is used, with different regimens, mainly itraconazole. New azolics such as posaconazole and voriconazole began to be used, but with limitations due to the high cost, the use of physical methods such as cryosurgery, thermotherapy, laser therapy and both. The low cure rates and high rates of relapse of the disease may be related to the different treatment methods employed and the lack of a standardized regimen itself. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* sensitivity of conidia and *in vitro* induced muriform cells of *Fonsecaea* spp. in the presence of different antifungal agents, to date there are no studies evaluating the action of drugs using the pathogenic form of the fungus, reinforcing the importance of this study, following the method established in the standard M38-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute. The minimum inhibitory concentration for each drug was obtained after 5 days of interaction, posaconazole showed better *in vitro* inhibitory activity for conidia (CIMMG = 0.632 $\mu$ g / ml) and muriform cells (CIMMG = 1 $\mu$ g / ml). In the analysis of the fungicidal concentration, in both conidia and muriform cells, posaconazole presented lower value (CFMMG = 6.72 $\mu$ g / ml, in both). The fungus samples presented distinct times to differentiate their conidia in muriform cells, therefore we believe that although they belong to the same genus the fungi present physiological peculiarities still unknown. In the *in vitro* susceptibility tests PCZ had the lowest inhibitory and fungicidal concentrations in both conidia and muriform cells, thus investing in susceptibility testing was important to identify sensitive or resistant strains

Keywords: chromoblastomycosis, *Fonsecaea* spp, antifungals.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CROMOBLASTOMICOSE

A cromoblastomicose (CBM) foi observada inicialmente no Brasil pelos pesquisadores Pedroso & Gomes, em 1911, em alguns pacientes em São Paulo, porém o relatório científico dessas observações só foram publicados em 1920 (MCGINNIS, 1983). Contudo, as primeiras descrições da doença ficaram sob mérito do médico alemão Max Rudolph, que publicou o primeiro casos de CBM da cidade de Estrela do Sul, Minas Gerais, Brasil, em 1914, embora o mesmo não tenha relatado a presença das formas parasitárias fúngicas ao exame micológico direto (CASTRO; CASTRO, 2009).

O nome “cromoblastomicose” foi definido em 1992 por Terra *et al.*, como sendo uma doença causada por fungos pigmentados, a 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 (MCGINNIS, 1983).

A CBM tem uma distribuição mundial (figura 1) e é frequentemente observada em regiões de climas tropicais e subtropicais. A república de Madagascar, oeste do continente africano, tem o maior registro de casos, contudo a casuística abrange outros países como Gabão, México, Brasil, Costa Rica, Porto Rico, Venezuela, Cuba, República Dominicana, Índia e Austrália (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2012). Na Ásia, os casos relatados são do Japão, China e Malásia. Enquanto que na Europa países como Rússia, República Tcheca, Romênia e Alemanha apresentam a maior parte dos casos europeus descritos (MARTÍNEZ; TOVAR, 2007).

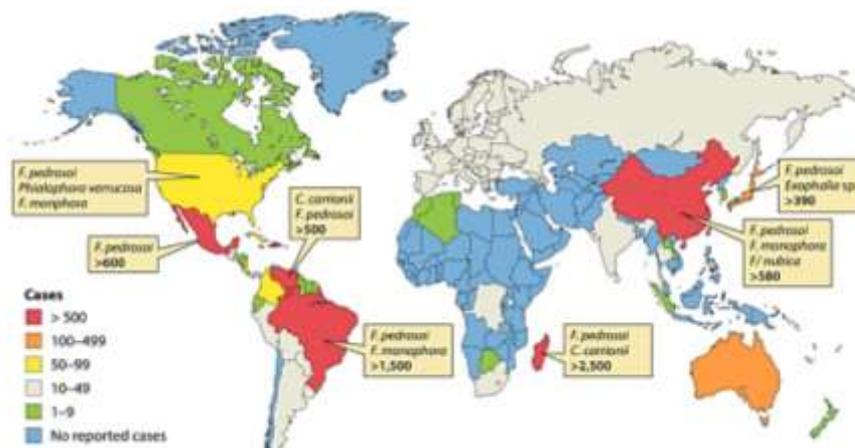


Figura 1. Distribuição dos casos de CBM no mundo, de acordo com casos relatados. Fonte: Telles *et al.*, 2017.

No Brasil, a região Amazônica tem sido considerada a principal área endêmica de CBM, com incidência estimada de 3/100.000 (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009; SILVA; DE SOUZA; ROZENTAL, 1999). Entre os estados brasileiros com maior média anual de casos relatados estão Pará, Maranhão, Paraná e Rio Grande do Sul (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 1992, 2011).

No Pará foram relatados 325, no período de 1942 a 1997, nos anos de 2001 a 2008 (SILVA; DE SOUZA; ROZENTAL, 1999), 110 casos foram registrados na Unidade de Referência Especializada em Dr. Marcello Candia (URE- Marcello Candia) (dados não publicados), o que contribui para que o nosso estado seja a principal área endêmica do país e a segunda maior em prevalência no mundo, atrás somente de Madagáscar (DE HOOG *et al.*, 2000; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011).

A CBM é a infecção fúngica mais comum causada por fungos melanizados e caracterizada por uma infecção granulomatosa que apresenta lesões crônicas cutâneas e subcutâneas, decorrente de um traumatismo transcutâneo prévio de diversas espécies de fungos filamentosos produtores de pigmentos melânicos (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009, 2017).

A CBM raramente acontece em crianças e adolescentes, embora no período de 1992 a 2004 já tenha sido relatado 22 casos em crianças e adolescentes venezuelanos. É uma doença de ocorrência e maior prevalência na população adulta, com idade de 40 a 50 anos e predominância na população masculina variando de 5 a 9:1 em relação ao população feminina (PEREZ-BLANCO *et al.*, 2006; QUEIROZ-TELLES, 2015).

A CBM é descrita como uma doença ocupacional em todo o mundo, principalmente por afetar trabalhadores agrícolas, jardineiros, lenhadores e vendedores de produtos agrícolas que relatam a inoculação traumática com material ambiental como: espinhos, “madeira bruta” e material vegetal em decomposição (MARQUES *et al.*, 2006; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011).

A presença destes fungos no ambiente sugere que os mamíferos sejam hospedeiros acidentais, podendo ser descrito da seguinte maneira: a) presença de forma filamentosas, conídios e células muriformes em material vegetal saudável ou em decomposição, b) inoculação acidental destas formas em mamíferos, resultando no surgimento de lesões, c) eliminação de células muriformes para o meio ambiente (LEÃO *et al.*, 2013).

## 1.2. AGENTES ETIOLÓGICOS

Os agentes etiológicos da CBM, segundo a classificação taxonômica, pertencem a ordem Chaetothyriales, família Herpotrichiellaceae (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Os agentes etiológicos (figura 2) relatados com mais frequência são *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora carrionii*, *Rhinocladiella aquaspersa* e *Exophiala dermatitidis*, sendo os dois últimos menos frequentes (KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014).

*F. pedrosoi* e *C. carrionii* são geralmente encontrados em regiões tropicais e subtropicais. *F. pedrosoi* é encontrado principalmente em áreas úmidas, enquanto *C. carrionii* é prevalente em climas semiáridos (QUEIROZ-TELLES, 2015). No Brasil, novas espécies foram descritas, como *F. pugnacius*, *Cyphellophora ludoviensis* e *R. tropicalis* a partir de casos de CBM brasileiros (GOMES et al., 2016).

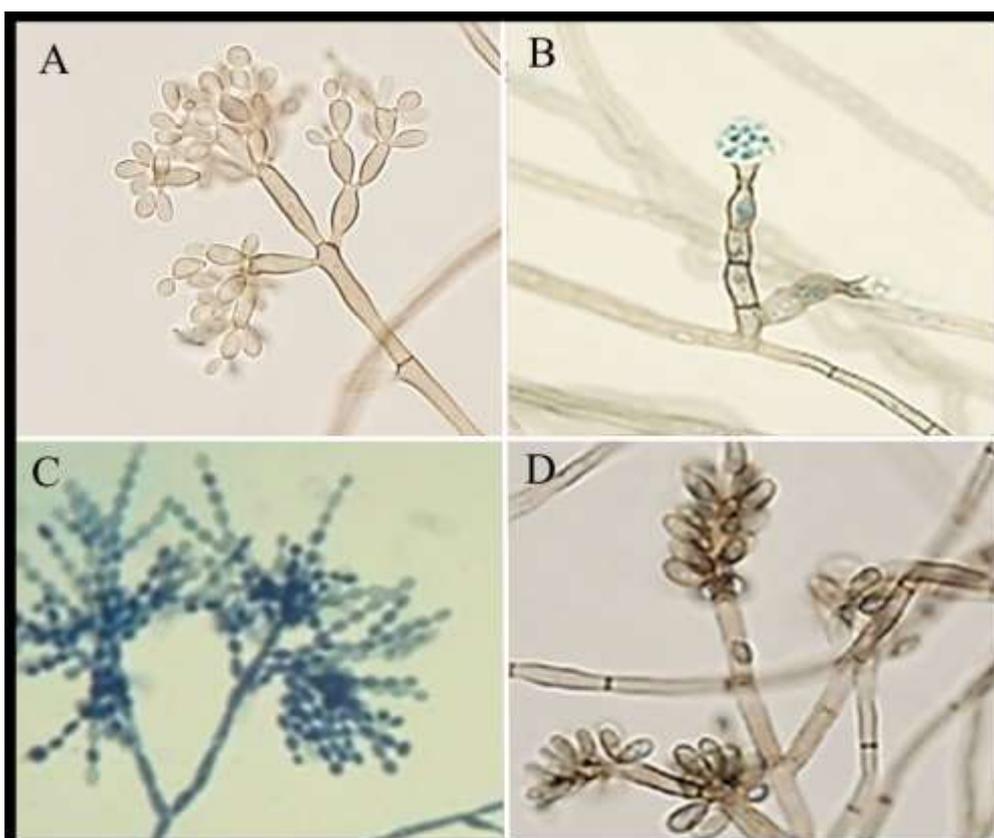


Figura 2. Principais agentes da cromoblastomicose. A) *F. pedrosoi*, B) *P. verrucosa*, C) *C. carrionii* e D) *R. aquaspersa*. Fonte: Arquivo do Laboratório de Dermato-Imunologia.

Os fungos que pertencem a ordem *Chaetothyriales* apresentam colônias de anverso em tons oliváceos, cinzentos ou negros, devido à presença da DHN-melanina, que é estruturalmente similar a Dopa-Melanina, sintetizada por seres humanos, a DHN-

Melanina difere-se por ser derivada do di-hidroxi-naftaleno (DHN) (EISENMAN; CASADEVALL, 2012), este pigmento é um importante fator de virulência em fungos patogênicos devido às suas propriedades antioxidante, termoestável e anti-radioativa (CUNHA *et al.*, 2010; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017). Os agentes etiológicos da CBM são seres sapróbios, podendo ser encontrado em plantas, como maria-fecha-a-porta (*Mimosa pudica*) e babaçu (*Orbignya phalerata Martius*) no solo em materiais em decomposição (MARQUES *et al.*, 2006; SALGADO *et al.*, 2004), onde são encontrados na sua forma vegetativa ou de micélio.

O principal agente etiológico, *F. pedrosoi* é um fungo melanizado, que apresenta uma colônia de textura aveludada, coloração verde oliva ao negro (figura 3A), com desenvolvimento ótimo a 33°C e termotolerância de crescimento a 37°C. A melanina presente em sua parede celular lhe confere integridade estrutural e proteção imunológica contra a resposta do hospedeiro, mascarando seus antígenos. A análise microscópica da colônia é possível após microcultivo em lâmina que nos permite a visualização de hifas (figura 3B) septadas, melanizadas e conidióforos (figura 3B) que se ramificam em direção ao ápice. Sua conidiogênese inclui padrões de formação de conídios observados em três outros gêneros tais com: *Cladophyalophora*, *Phialophora* e *Rhinocladiella*, sendo a conidiação do tipo cladosporium é a mais comumente observada e característica da espécie (SANTOS *et al.*, 2007).

O *F. pedrosoi* é um fungo dimórfico não clássico, apresentando-se em uma fase sapróbia no solo, na qual são encontradas formas conidiais e miceliais, e um estágio parasítico, chamado de células muriformes (figura 3C), com pigmentações na cor amarelo-acastanhadas, com parede celular espessa, divisão transversal e longitudinal (ALVIANO *et al.*, 2003).

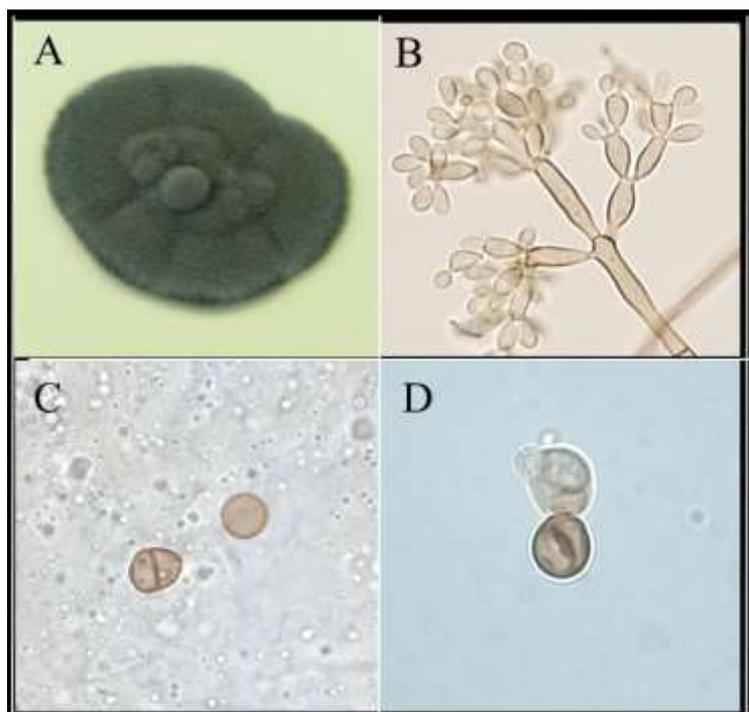


Figura 3. Características do *Fonsecaea pedrosoi*. A) Colônia cultivada em meio Ágar Batata. B) Microcultivo com conidiação do tipo Cladosporium e hifas septadas. C) Células muriformes obtida de exame micológico direto e *in vitro* em meio quimicamente definido (D). Fonte: Arquivos do Laboratório de Dermato-Imunologia

Em complementação à caracterização microscópica de espécies do gênero *Fonsecaea* vários estudos moleculares têm sido desenvolvido e estes incluem análise de sequência de  $\beta$ -tubulina, actina e regiões de DNA ITS ribossomal (DE HOOG et al., 2004; NAJAFZADEH et al., 2011). O DNA ITS é usado como padrão para a construção filogenética deste gênero e a expressão de genes como ACT1, BT2 e Cdc42 são importantes na progressão do ciclo celular e na construção do citoesqueleto de actina e estão envolvidos na alteração morfo genética, levando à grandes células esféricas, que logo entram em divisão celular e originam as células muriformes. A presença da melanização nesses fungos é um fator protetor importante bem documentado para fungos negros, assim a síntese de melanina é dada pela expressão de genes como Lac e HmgA (SUN *et al.*, 2012), essa síntese ocorre em estruturas chamadas melanossomos. Os melanossomos de *F. pedrosoi* apresentam uma matriz fibrilar, semelhante a encontrada em anfíbios, em que funcionam como um local de depósito de melanina, onde a partir destes a melanina será exportada para a parede celular e depositada em camadas concêntricas (FRANZEN *et al.*, 2008).

A diferenciação de hifas e conídios em células muriformes ainda não foi elucidada, embora o conhecimento do controle experimental destes processos tenha

aumentado nos últimos anos. As primeiras tentativas de produção de células muriformes *in vitro*, datam de 1957, com a utilização de um “*synthetic lymph médium*” com obtenção de corpos esféricos, articulados em fragmentos de hifa semelhantes a clamidósporos, após 35 dias (SILVA, 1957).

Em 1985, Ibrahim-Granet, *et. al.* obtiveram células arredondadas, em um tempo de 30 dias, a partir de uma cepa de *F. pedrosoi*, no qual denominaram de *yeast-like* por não apresentarem a septação característica das células muriformes observadas no tecido vivo, usando meio Sabourard, com pH ajustado para 2,5 (com HCl), sob agitação constante a 20°C (IBRAHIM-GRANET; GUÉCHO; DE BIEVRE, 1985), células muriformes podem ser obtidas, também, após 45 dias de cultura sob agitação em meio Butterfield acrescido de biotina, tiamina e DL-propanolol (ALVIANO *et al.*, 1992).

Em 1993, utilizando um meio quimicamente definido, adicionado de Ca<sup>+2</sup>, EGTA, induz células escleróticas após 21 dias de cultivo (MENDONZA; KARUPPAYIL; SZANISZLO, 1993). Mais recentemente, utilizou o fator ativador de plaquetas (PAF) para induzir a formação de células escleróticas de *Fonsecaea pedrosoi* (ALVIANO *et al.*, 2003).

Os estudos, mais recentes, voltados para indução de células muriformes são de Silva *et.al.* que propuseram os meios de cultura obtidos da biomassa de *Theobroma grandiflorume* e *Bactris gasipaes* para obtenção de células muriformes, conseguindo reduzir o tempo de indução de células muriformes *in vitro* para 48 horas (DA SILVA *et al.*, 2008).

### 1.3. ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO

A infecção é decorrente da implantação traumática transcutânea de fungos filamentosos melanizados. No ponto de inserção se inicia uma lesão que progride cronicamente com comprometimento cutâneo e subcutâneo, que podem se espalhar e produzir lesões satélite, nestes pontos o prurido é a principal manifestação clínica (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009, 2017). Em 2004, Salgado *et al.* demonstraram a presença de hifas e conídios de *F. pedrosoi* nos espinhos de *M. pudica* e posteriormente observaram células muriformes, semelhantes às células encontradas na lesão dentro de espinhos da mesma planta, o que faz permanecer incerto qual a forma fúngica responsável pelo início da doença e se o hospedeiro e/ou o agente são responsáveis por formas clínicas da CBM (DA SILVA *et al.*, 2008; SALGADO *et al.*, 2004, 2005).

As lesões iniciais, se não diagnosticadas precocemente, progridem e assumem diferentes tipos de formas clínicas e de gravidade. A progressão da lesão se dá pelo envolvimento progressivo e crônico de estruturas teciduais cutâneas e subcutâneas em uma resposta granulomatosa fibrosa com microabscessos embutidos e a presença de células muriformes (escleróticas) no tecido afetado que são facilmente observadas por microscopia óptica e que resistem a morte pelo hospedeiro e permitindo a evolução da inflamação granulomatosa (DA SILVA *et al.*, 2008; MARQUES *et al.*, 2004; MATSUMOTO *et al.*, 1984).

De acordo com Cárrión, a CBM pode apresentar diferentes formas clínicas: nodular, tumoral, verrucosa, em placa e cicatricial, onde uma lesão inicial, do tipo papulosa ou verrucosa, evolui para as diferentes formas clínicas mencionadas e, depois, cronicamente com edema e aumento de volume do membro afetado (CARRIÓN, 1950). Outro método de classificação proposto é segundo a gravidade do quadro clínico, do número, da extensão e disseminação das lesões. A lesão nodular ou uma placa solitária com menos de 5 cm de diâmetro define o quadro clínico como leve, se as lesões cobrirem um ou duas regiões cutâneas, com menos de 15 cm de diâmetro, o quadro seria definido como moderado, enquanto as formas graves seriam aquelas com lesões extensas (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 1992).

Salgado *et al.*, em 2005, descreveram um novo tipo clínico, a cromoblastomicose difusa cutânea, caracterizada por lesões nodulares-verrucosas com distribuição difusa na pele, com quadro clínico semelhante ao de outras doenças infecciosas figura 4 (SALGADO *et al.*, 2005). O mesmo grupo publicou três casos da doença em que os aspectos clínicos se apresentavam de maneira diferente em relação aos que já haviam sido descritos, assim os três casos de lesões localizadas com aspecto papulomatoso, escamasos agrupados em uma lesão de formato anular foi denominada de CBM cutânea localizada (SALGADO *et al.*, 2009). Conforme observado na figura 4 surgiu uma nova classificação para doença, que se baseia no aspecto da lesão ao longo do processo evolutivo da CBM e que se correlacionam a resposta terapêutica ao itraconazol.



Figura 4. Classificação da CBM de acordo com o aspecto das lesões. A doença pode ser dividida em: CBM cutânea localizada, que está dividida em: anular, em placa, nodular e CBM cutânea Difusa. Fonte: Leão, 2013.

As manifestações clínicas não são suficientes para confirmar o diagnóstico da CBM, se faz necessário a realização do exame micológico direto (EMD), a partir da raspagem da lesão cutânea o material coletado pode ser clarificado com hidróxido de potássio (KOH) entre 10% e 20% ou lactofenol, através deste exame onde podemos visualizar células muriformes que se apresentam na forma redonda-poliédrica, coloração acastanhada, com uma parede celular espessa, pigmentada e septações transversais e longitudinais (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; QUEIROZ-TELLES; SANTOS; AZEVEDO, 2008).

O EMD pode ser complementado pelo exame histopatológico que revela uma epiderme com paraceratose e hiperplasia pseudoepiteliomatosa e derme com um infiltrado mononuclear, apresentando em maior ou menor quantidade de neutrófilos que, por vezes, formam microabscessos e granulomas isolados e confluentes, associados a células gigantes que podem conter células muriformes.

#### 1.4. TRATAMENTO

O tratamento da CBM ainda é um desafio, pelo fato da doença está relacionada a uma baixa taxa de cura e elevada taxa de recidivas, especialmente em quando se manifesta em infecções crônicas e lesões extensas, além da falta de um tratamento padronizado. Contudo, vários regimes terapêuticos físico, terapias tópicas ou sistêmicas com agentes antifúngicos foram propostas (GARNICA; NUCCI; QUEIROZ-TELLES, 2009; QUEIROZ-TELLES; DE C L SANTOS, 2013).

A modalidade de tratamento físico disponível é usada como terapia adjuvante em combinação com agentes antifúngicos e incluem exérese cirúrgica, termoterapias,

terapia com laser e terapia fotodinâmica (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017). Acredita-se que a escolha terapêutica e o resultado do tratamento são influenciados por fatores como: agente etiológico, profundidade e/ou extensão das lesões, topografia clínica e presença de complicações/agravantes (fibrose dérmica e edema podem reduzir os níveis antifúngicos nos tecidos), devendo ser considerado também o custo e a disponibilidade de medicamento no local de tratamento do paciente. (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006)

A terapia medicamentosa é longa e consiste na administração de doses elevadas de antifúngicos, sendo os principais agentes utilizados: itraconazol (ITZ) (200-400 mg diários) e a terbinafina (TRB) (500-1000 mg diários), ambos demonstraram boa atividade *in vitro* contra espécies causadoras de CBM. Novos azólicos como posaconazol (PCZ) e voriconazol (VCZ) começaram a ser utilizados em casos de CBM, entretanto a experiência de tratamento é limitada devido ao alto custo desses antifúngicos (AMEEN, 2010; NEGRONI *et al.*, 2005).

Os pacientes que apresentam a forma clínica anular quando tratados com ITZ a 200 mg/dia apresentam cura clínica em 6 a 12 meses de tratamento, enquanto que pacientes com outras formas clínicas apresentam cura em 9 meses a mais de 3 anos (figura 4), embora a cura clínica da doença só possa ser definida pela resolução completa das lesões, geralmente estas deixam cicatrizes, já a cura micológica se dá a partir de resultados negativos em microscopia e cultura em meios de crescimento (AMEEN, 2010).

A CBM é listada como uma doença negligenciada, descrita pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que ocorre em regiões geográficas tropicais e subtropicais de países em desenvolvimento e acomete principalmente a população de baixa renda, não despertando interesse na indústria farmacêutica na busca de novas alternativas terapêuticas, assim a carga e o impacto médico da CBM são certamente subestimados e até mesmo não diagnosticados ou tratados adequadamente (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).

## 1.5. FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

Os agentes antifúngicos constituem uma série de medicamentos que têm diversas ações frente aos fungos causadores de micoses superficiais, subcutâneas e profundas, tanto patógenos primários quanto oportunistas. Estes fármacos podem se

dividir de acordo com suas diferentes características, como o mecanismo de ação, composição química, espectro de ação e o tipo de micose que atuam (BONIFAZ TRUJILLO, 2012).

Atualmente, apenas três classes principais de antifúngicos são aprovadas para tratamento de pacientes com infecções fúngicas invasivas: polienos, triazóis e equinocandinas. Esses agentes têm como alvo ergosterol, lanosterol 14-a-desmetilase e b-1,3 glucan sintase, respectivamente (figura 5) (ROEMER; KRYSAN, 2014).

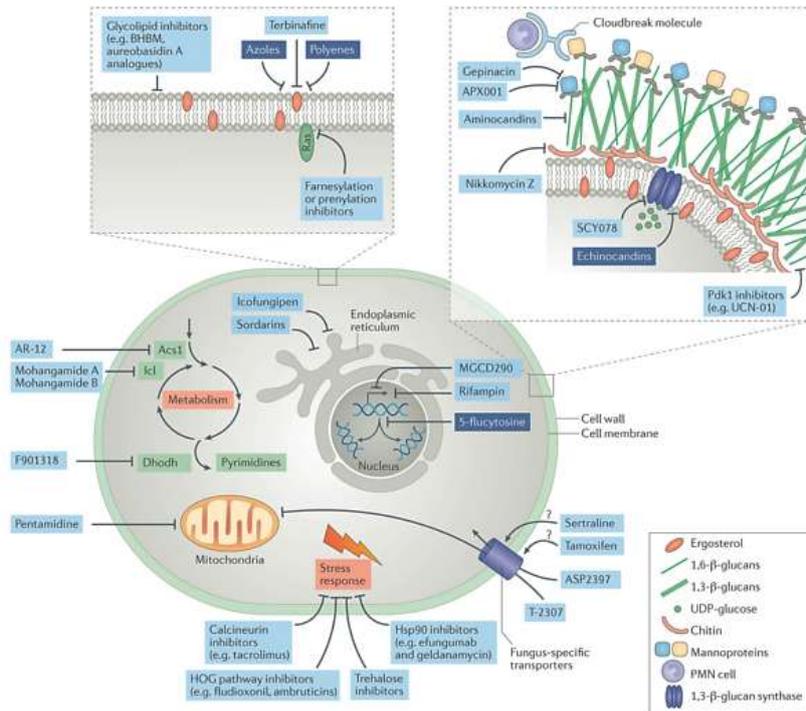


Figura 5. Alvos dos antifúngicos sistêmicos. Fonte: PERFECT, 2017.

Os antifúngicos azólicos possuem anéis orgânicos de cinco membros (anel azól) e são classificados em imidazóis (ex.: miconazol e cetoconazol) ou triazóis (ex.: itraconazol, fluconazol, posaconazol e voriconazol) de acordo com a presença de dois ou três átomos de nitrogênio no anel azól, respectivamente (MAZU *et al.*, 2016).

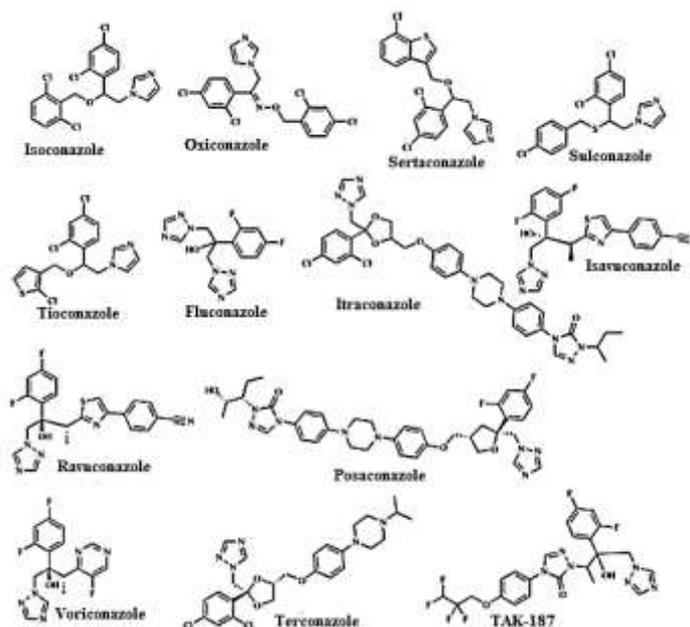


Figura 6. Agentes antifúngicos triazólicos. Estruturas químicas dos agentes azólicos. Fonte: MAZU et al., 2016.

Antifúngicos azólicos inibem a enzima P450 do citocromo fúngico, atuando sobre o lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase (CYP51), uma enzima chave na síntese do ergosterol, que é o principal lipídeo da membrana celular fungica (CHANG *et al.*, 2017).

Fluconazol e itraconazol são os triazóis de primeira geração e tornaram-se comercialmente disponíveis no início dos anos 90, ambos têm um perfil de segurança melhorado em comparação aos imidazóis. O fluconazol, que é altamente solúvel em água e disponível em formulações orais e intravenosas, é o único membro dos triazóis de primeira e segunda geração com alta biodisponibilidade confiável e mínima variação na absorção (GIRMENIA, 2009), o itraconazol apresenta menor biodisponibilidade, que pode ser causada pela variação em sua absorção, porém exibe um espectro de atividade muito mais amplo do que o fluconazol (NETT; ANDES, 2016).

Os triazóis de segunda geração, como posaconazol, voriconazol e isavuconazol (ISA), foram desenvolvidos com o objetivo de melhorar a farmacocinética e o espectro de atividade e permitir ampla interação medicamentosa. (GIRMENIA, 2009; NETT; ANDES, 2016).

O posaconazol tem um espectro muito amplo de atividade antifúngica e de atividade profilática no tratamento de infecções fúngicas invasivas, tendo sido relatada sua eficácia como antifúngico profilático em pacientes neutropênicos com malignidade

hematológica, além de ser uma opção efetiva de terapia de resgate para pacientes que não respondem às terapias antifúngicas padrão (KIM; WILLIAMS, 2014).

Entre os azóis, apenas o posaconazol e o itraconazol têm atividade contra esses fungos de difícil tratamento. O posaconazol também tem melhor eficácia do que o fluconazol na profilaxia de infecções fúngicas sistêmicas (CORNELLY *et al.*, 2007; MCKEAGE, 2015).

O outro azol de segunda geração é o voriconazol, que é um antifúngico triazólico com uma estrutura relacionada ao fluconazol e um espectro de atividade comparável ao do itraconazol. O voriconazol foi aprovado pela *Food and Drug Administration*, em maio de 2002, para o tratamento de aspergilose invasiva e infecções refratárias de *Scedosporium apiospermum* e *Fusarium* spp (GREER, 2003). Este azol tem um espectro de atividade substancialmente mais amplo que os azólicos de primeira geração. Tanto o voriconazol quanto o posaconazol apresentam baixa solubilidade em água (GIRMENIA, 2009). Dependendo do composto em particular, os agentes antifúngicos azólicos têm atividade fungistática e de amplo espectro contra a maioria das leveduras e fungos filamentosos (MAZU *et al.*, 2016).

As equinocandinas são a nova classe de antifúngicos aprovada pelo FDA (*Food and Drugs Administration*) para o tratamento de infecções fúngicas invasivas (figura 7). As três equinocandinas aprovadas para o uso clínico são: caspofungina, micafungina e anidulafungina (WALKER *et al.*, 2011), cada uma é derivada de modificações semisintéticas de antibióticos lipopeptídicos, que inibem o complexo enzimático sintético de parede celular  $\beta$ -1,3-d-glucano sintase (figura 5). A incapacidade do organismo de construir  $\beta$ -1,3-d-glucano desestabiliza a integridade da d-glucana sintase fúngica e conseqüentemente da parede celular do fungo, levando à instabilidade osmótica e morte celular (KOFULA; RUHNKE, 2011).



Figura 7. Equinocandinas. Estrutura química Fonte: MAZU *et al.*, 2016.

As equinocandinas apresentam ação fungistática contra *Aspergillus fumigatus*, embora sejam altamente eficazes, com ação fungicida contra a maioria das espécies do gênero *Candida*, incluindo cepas (e biofilmes) que são resistentes aos azóis ou a anfotericina B, como observado em *C. krusei* (LETSCHER-BRU; HERBRECHT, 2003). As equinocandinas têm um espectro antifúngico bastante restrito, portanto, são limitadas em sua utilidade clínica. A caspofungina é o primeiro dos primeiros agentes antifúngicos de equinocandina em classe aprovados em uso clínico. A sua introdução foi rapidamente seguida por micafungina e anidulafungina (MAZU *et al.*, 2016).

A atividade fungicida da caspofungina foi demonstrada em *Candida* spp. Estudos *in vitro* demonstraram que o composto tem um efeito fungistático em fungos filamentosos, como espécies de *Aspergillus* spp. Também possui uma ação fungicida não convencional, atuando seletivamente nas extremidades das hifas, que são o local de síntese da parede celular essencial para o crescimento apical do fungo. Em fungos dimórficos é ativa contra *Blastomyces dermatitidis*, e de maneira mais inconstante contra a *Histoplasma capsulatum* (ESPINEL-INGROFF, 1998; KOFLA; RUHNKE, 2011; KOHLER *et al.*, 2000).

#### 1.6. TESTES DE SENSIBILIDADE *in vitro* A AZÓLICOS

A determinação da suscetibilidade *in vitro* a fármacos antifúngicos é importante para avaliar a resistência microbiológica do fungo, mas não é útil para uma previsão da resposta clínica do paciente, que pode depender tanto do hospedeiro quanto da cepa ou das diferentes estruturas fúngicas, como já foi demonstrado na interação de conídios ou células muriformes com células de Langerhans, onde estas células tem sua função imune inibida na interação patógeno-hospedeiro (DA SILVA *et al.*, 2007). Embora ainda desconhecido, o perfil de resistência das células muriformes pode ser o responsável pela maior tolerância a ação dos fármacos antifúngicos utilizados no tratamento. Assim, é necessário uma interpretação cautelosa dos resultados obtidos com outras estruturas fúngicas, não encontradas no tecido humano (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).

Alguns estudos já avaliaram a suscetibilidade *in vitro* de diferentes agentes da CBM a azólicos, como ITZ, VCZ, PCZ e ISA (DABOIT *et al.*, 2013; DENG *et al.*, 2013; FENG *et al.*, 2012). Outro estudo realizado verificou a suscetibilidade antifúngica

entre espécies do gênero *Fonsecaea* e os resultados exibiram valores de concentração inibitória mínima (CIM) baixos para ITZ, VCZ, PCZ e ISA, no estudo o PCZ apresentou atividade significativa contra as espécies testadas, indicando que este azólico tem potencial aplicação no tratamento da CBM (NAJAFZADEH *et al.*, 2010).

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), em 2008, publicou o documento M38-A2 padronizando testes de suscetibilidade para fungos filamentosos como as espécies *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Pseudallescheria boydii* (*S. apiospermum*), *S. prolificans*, a forma micelial de *Sporothrix schenckii*, zigomicetos, dermatófitos e fungos demáceos, sugerindo um avanço para o estabelecimento de uma técnica confiável. Para que não haja viés nos resultados algumas medidas devem ser adotadas a fim de manter o padrão e a confiabilidade dos testes, tais como: preparo do inóculo, tempo e temperatura incubação, composição do meio cultivo e o pH do meio e leitura da concentração inibitória mínima. Os antifúngicos avaliados na norma são: fluconazol, cetoconazol, ITZ, VCZ, ravuconazol, PCZ, flucitosina e anfotericina B, terbinafina, griseofulvina, ciclopirox e os equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina (CLSI, 2008).

A ausência de métodos padronizados para avaliação a sensibilidade de fungos filamentosos melanizados, leva a uma clara necessidade de padronização dos testes de suscetibilidade *in vitro* principalmente pela dificuldade de se realizar um tratamento eficiente (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006; REVANKAR; SUTTON, 1986). Além da utilização do azólico ITZ no tratamento da CBM no estado do Pará, alguns estudos têm demonstrado a eficácia de outros compostos azólicos, como PCZ ou VCZ, em avaliações *in vitro*, embora estes tenham sido demonstrados na forma saprobia do fungo. A escassez de trabalhos utilizando a forma parasitária (células muriformes) é o ponto chave para realização desta pesquisa, para embasamento da terapêutica mais apropriada principalmente por este tipo celular ser o encontrado no hospedeiro humano infectado. Testes comparativos de suscetibilidade entre inóculos de conídios e células muriformes também são de grande interesse a fim de auxiliar a seleção do antifúngico de melhor ação e na tentativa de trilharmos melhores caminhos na terapêutica da doença.

Nos últimos anos vários estudos têm sido feito para avaliar a suscetibilidade *in vitro* de agentes da CBM a diversas classes de antifúngicos, porém nestes estudos a base de testes são a forma saprofitica dos fungos negros e isto de certa forma acaba distanciando das condições que encontramos a doença no hospedeiro humano, tendo em

que no hospedeiro a forma encontrada do fungo são as células muriformes (escleróticas). A realização de estudos que utilizem a forma tecidual parasitária é inédita e que pode vir a contribuir para um melhor direcionamento na escolha terapêutica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Avaliar a sensibilidade *in vitro* de conídios e células muriformes de *Fonsecaea* spp em relação a diferentes antifúngicos.

### 2.2. ESPECÍFICOS

- Descrever o perfil epidemiológico dos pacientes diagnosticados com cromoblastomicose, atendidos na Unidade de Referência em Dermatologia Sanitária do Estado do Pará Dr. Marcello Candia.
- Induzir células muriformes a partir de culturas de *Fonsecaea* spp.
- Determinar as concentrações inibitórias mínima e as concentrações fungicidas mínima de conídios e células muriformes frente aos antifúngicos itraconazol, posaconazol, voriconazol, fluconazol e caspofungina.
- Comparar as CIMs e CFMs entre conídios e células muriformes, em relação a cada fármaco.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. AMOSTRAS FÚNGICAS

Foi utilizado 12 amostras fúngicas, mantidas na Micoteca Laboratório de DermaImunologia, do sendo uma cepa padrão ATCC, gentilmente cedida pela Profa. Dr. Maria Lúcia Scroferneker (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), e 11 isolados clínicos obtidos de a partir do raspado das lesões dos pacientes de CBM atendidos na Unidade de Referência em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Candia, confirmados clinicamente e por realização do exame micológico direto, como parte do procedimento padrão de atendimento para diagnóstico e posterior tratamento dos pacientes. Para controle de qualidade foi utilizado uma cepa padrão de *Candida krusei*. As informações referentes aos dados epidemiológicos foram obtidas através das análises de prontuários.

As amostras foram isoladas em meio Ágar Mycosel (Becton Dickinson, NJ, USA) por um período de 15-20 dias e em seguida semeadas no meio Ágar Batata (Sigma-Aldrich, MO, USA), mantidas a temperatura de 30°C, por 15-20 dias, até a visualização de uma colônia enegrecida com superfície aveludada. A identificação genérica do agente etiológico deu-se pela técnica de microcultivo em lâmina e a identificação molecular dos mesmos foi realizada no Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), de acordo com protocolo estabelecido pelos mesmos (GOMES et al., 2016).

Todos os pacientes que participaram deste estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido devidamente aprovado pelo Comitê de Ética. (Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará, sob o protocolo n° 081/07 CEP-ICS/UFPA.)

## 3.2. TESTE DE SUSCETIBILIDADE *in vitro* A ANTIFÚNGICOS

### 3.2.1. Preparação dos fármacos antifúngicos

O preparo dos agentes antifúngicos realizamos segundo as orientações da norma M38-A2, descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), para uso destes agentes em estudos de suscetibilidade *in vitro*. Assim, as soluções foram preparadas em concentrações 100X em relação às concentrações finais. Inicialmente, as soluções-estoque de Itraconazol (ITZ; Sigma-Aldrich, MO, USA), Posaconazol (PCZ; Sigma-Aldrich, MO, USA) e Voriconazol (VCZ; 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.

Em seguida, foi feita uma diluição de 1:50 em RPMI (Sigma-Aldrich, MO, USA) tamponado com MOPS (Sigma-Aldrich, MO, USA), com pH de 7,0, atingindo concentrações de 32 µg/ml a 0.0625 µg/ml, 2X a concentração final desejada para estes fármacos.

O Fluconazol (FCZ; Sigma-Aldrich, MO, USA) foi diluído 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 1:5 com RPMI (Sigma-Aldrich, MO, USA) tamponado com MOPS (Sigma-Aldrich, MO, USA).

### 3.2.2. Preparo da suspensão de conídios

As amostras fúngicas foram cultivadas em meio Ágar Batata (Sigma-Aldrich, MO, USA), para induzir a conidiação em um período de 15 dias em temperatura de 30°C. Para suspensão dos conídios adicionamos 5 ml de solução fisiológica sobre a colônia e com o auxílio de uma alça de platina realizamos uma raspagem superficial para despreendimento dos conídios e suspensão dos mesmos na solução. A solução fúngica formada transferimos para tubo tipo Falcon de 15 ml e agitada em vortex por 20 segundos, para desagregar os conídios de seus conidióforos. Em seguida, filtramos em membrana de nylon (40nm) para retenção das hifas e centrifugamos a 3000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante descartamos e o pellet ressuspendido em 1ml com solução fisiológica. A densidade das células foi ajustada para faixa de 0.15 a 0.17 por espectrofotômetro (comprimento de onda de 530nm), correspondendo a uma faixa de

$10^5$ - $10^6$  céls/ml (Norma M38 A2). Para distribuição na placa de microtitulação a suspensão foi diluída em 1:50 em meio de cultivo sintético RPMI (Sigma-Aldrich, MO, USA), tamponado com MOPS (Sigma-Aldrich, MO, USA).

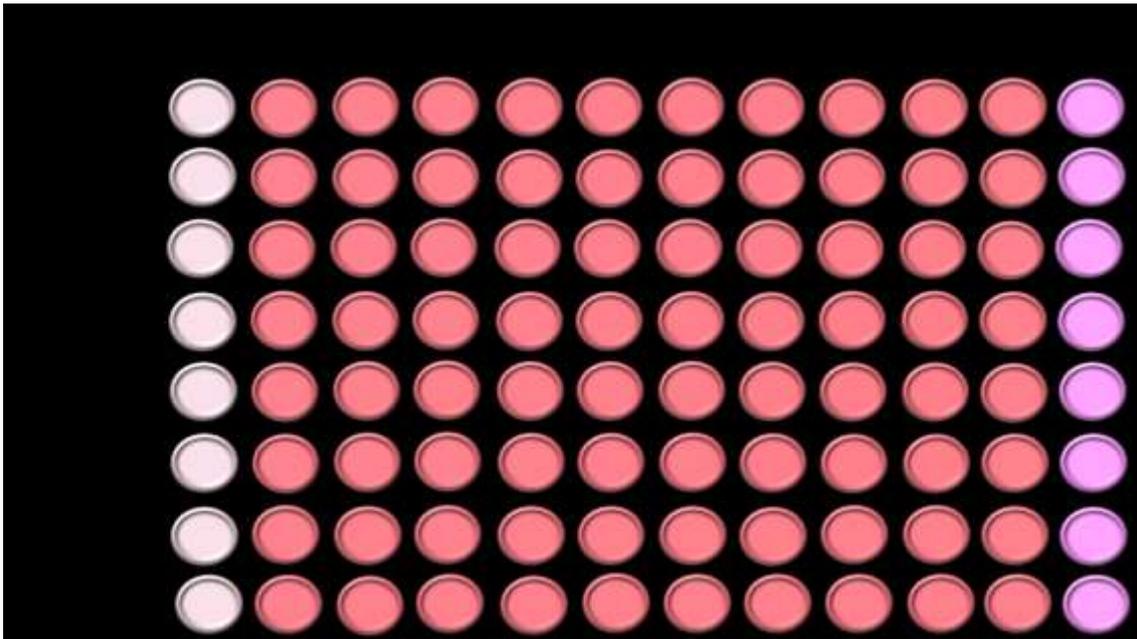
### 3.2.3. Obtenção e preparo da suspensão de células muriformes

Após a obtenção e contagem dos conídios a indução se dá em placas de cultivo celular com 24 poços de fundo chato (TPP, Suíça) onde adicionamos 1 ml de meio de indução de células muriformes (M.I.C.E) (SALGADO et al., 2008) e uma concentração de  $10^4$  conídios/ml; contados em câmara de Neubauer e mantido em estufa de  $CO_2$ , com temperatura de  $30^\circ C$ , sem agitação, por um período de 5 a 10 dias.

Após a indução, estas células são retiradas dos poços e transferidas para tubos Falcon de 15 ml. Neste tubo foi adicionado meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, MO, USA) tamponado com MOPS (Sigma-Aldrich, MO, USA) até 10 ml e centrifugado durante 3 minutos a 4000 RPM para retirar a acidez do meio de indução de células muriformes. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, ficando apenas 1ml de solução. A densidade celular foi ajustada para faixa de 0.15 a 0.17 por espectrofotômetro (comprimento de onda de 530nm) que segundo a norma M38 A2 corresponde a uma faixa de  $10^5$ - $10^6$  céls/ml. Para distribuição na placa de microtitulação a suspensão foi diluída em 1:50 em meio de cultivo sintético RPMI (Sigma-Aldrich, MO, USA), tamponado com MOPS (Sigma-Aldrich, MO, USA).

### 3.2.4. Interação de antifúngicos x conídios ou células muriformes

Em placa de microtitulação foi distribuído alíquotas de 100 $\mu$ l do agente antifúngico e 100 $\mu$ l de conídios ou células muriformes, a concentração final para o ITZ, PCZ, VCZ, CAS foi de 16 a 0.03 $\mu$ g/ml, e para FCZ foi de 128 a 0.25  $\mu$ g/ml, onde cada coluna corresponde a uma concentração (colunas 2 a 11), as colunas 1 e 12 correspondem aos controles negativo e positivo respectivamente, a interação foi observada por um período de 5 dias. Durante os 5 dias de interação, realizamos a leitura da D.O. no primeiro dia de experimento e no quinto dia, para acompanhamento. Os experimentos foram realizados de forma independente e em duplicata para cada amostra.



**Figura 8. Distribuição dos antifúngicos diluídos nas microplacas.** Os antifúngicos foram distribuídos em diferentes concentrações desde a coluna 1 até a 10 correspondendo cada coluna uma concentração. As colunas 11 (C+) e 12 (C-) funcionaram como o controle positivo de crescimento e o controle de negativo, contendo meio de cultura RPMI mais fungo e meio de cultura RPMI, respectivamente.

#### 3.2.5. Determinação da CIM

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada segundo a normal M38-A2, onde após cinco dias de incubação a temperatura de 30°C, sendo considerada a mínima concentração do antifúngico capaz de inibir a diferenciação visual dos conídios e das células muriformes em hifas quando comparado com o controle de crescimento, bem como gerar uma diferença estatística significativa na leitura de densidade óptica a 530nm em leitor de microplaca (Dynex Technologies, Chantilly, EUA) quando comparado com os grupos onde houve crescimento. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

#### 3.2.6. Determinação da CFM

Após 5 dias de interação e leitura da CIM para os conídios e células muriformes, determinou-se a concentração fungicida mínima (CFM). Uma alíquota de 20 µl dos poços em que não se observou diferenciação foi transferida para placas com meio Ágar-Batata (Sigma-Aldrich, MO, USA), no teste foi incluído um controle positivo de crescimento. As placas foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> com temperatura de 30°C e

observadas por cinco dias e crescimento foi visualmente observado. Determinou-se como CFM a concentração mínima em que impede o crescimento fúngico.

### 3.2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi feita no programa GraphPad 6<sup>®</sup> (GraphPad Software, CA, USA) e os dados expressos em média geométrica (MG) representa uma medida de tendência central de uma série valores em progressão geométrica. Testes de Mann Whitney, de dados não pareados para comparação das concentrações inibitórias e fungicidas entre conídios e células muriformes nas diferentes concentrações dos antifúngicos e Kruskal Walls para comparação entre os fármacos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MURIFORMES *in vitro*

A obtenção de células muriformes *in vitro* foi constatada a partir do momento em que na placa de cultura visualizamos as estruturas arredondadas, acastanhadas, com parede celular espessa e multiseptadas, semelhantes as encontradas no tecido humano (figura 9A, B e C), apresentando-se em grupos ou isoladas, observamos também uma nova célula muriforme sendo formada a partir de um conídio (figura 9C), semelhante aos achados de Da Silva et. al (DA SILVA *et al.*, 2008) e que são semelhantes as estruturas patogênicas dos agentes da CBM observadas *in vivo* (9 D, E e F).

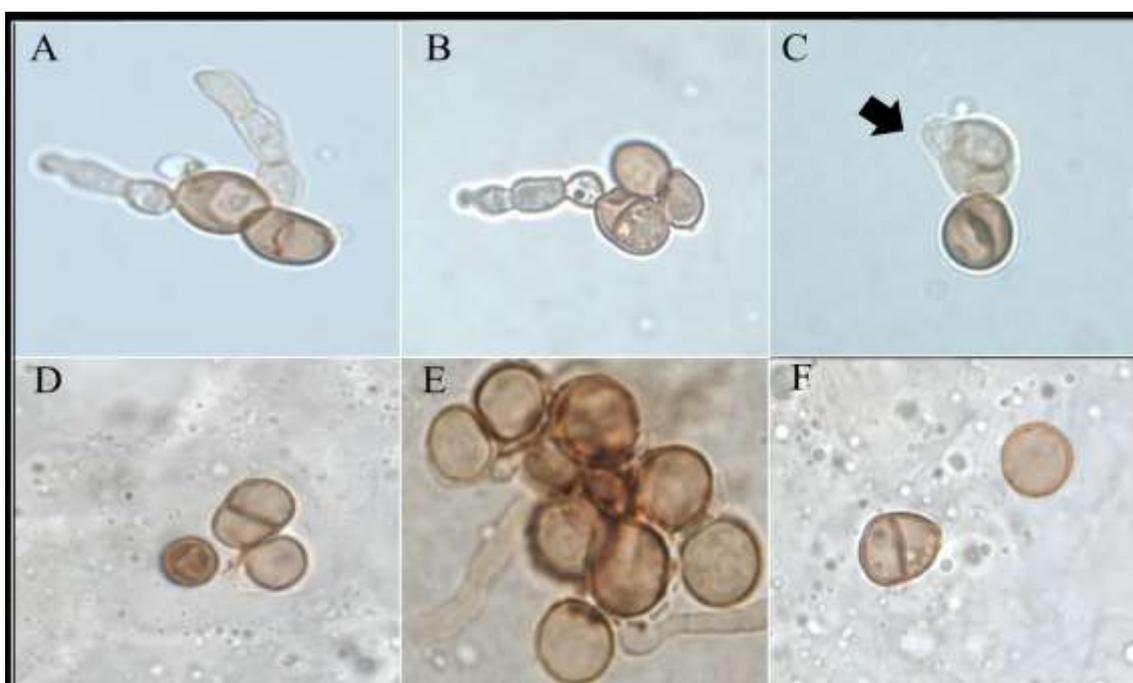


Figura 9. Comparação de células muriformes induzidas com as células muriformes de exame micológico direto. Em A, B e C visualizamos células muriformes induzidas *in vitro*, das amostras 5 e 7, respectivamente. Onde em C podemos visualizar o restante de um conídio e uma nova célula muriforme em formação. D, E e F mostram células muriformes obtidas diretamente da lesão de pacientes, podendo encontrar-se em grupos ou isoladas.

Embora a escassez de estudos a respeito da obtenção *in vitro* de células muriformes seja um fator limitante na comparação entre os tipos celulares, estudos desde 1985 vem sendo feitos para conseguir tal objetivo, uns sem sucesso na obtenção de células similares, como nos estudos de IBRAHIM-GRANET *et al.* que obtiveram células leveduriformes, mas que não apresentavam as septações que conferiam as

características de uma célula muriforme, chamando-as de *yeast-like* (IBRAHIM-GRANET; GUÉCHO; DE BIEVRE, 1985) e outros já com obtenção de células semelhantes as teciduais, como nos estudos de DA SILVA *et al.* que ao utilizar um meio de indução a partir de um material vegetal conseguiu células com as mesmas características de tamanho, cor e a presença de multisseptação, além da primeira observação em que a parede celular dos conídios quebra em um ponto e uma nova célula muriforme é formada (DA SILVA *et al.*, 2008).

Este estudo revelou que apesar de serem agentes etiológicos do mesmo gênero e alguns da mesma espécie percebemos que o tempo, em dias, em que as células muriformes se formaram foi diferente, então o processo de indução de células muriformes não foi comum a todas as amostras fúngicas utilizadas. Assim, o tempo médio de indução neste estudo, ou seja, o tempo de diferenciação dos conídios obtidos da cultura fúngica, que inseridos no meio sintético de indução, até o aparecimento de células escleróticas foi de 8 dias, um tempo bem reduzido em comparação as células obtidas por Alviano *et al.*, utilizando meio Butterfield, que precisaram de 45 dias (ALVIANO *et al.*, 1992; DA SILVA *et al.*, 2002). Ibrain-Granet e de Bierre após 30 dias obtiveram células arredondadas de uma cepa de *F. pedrosoi* denominada *yeast-like*, por não apresentaram septação como células muriformes observadas no tecido hospedeiro (IBRAHIM-GRANET; GUÉCHO; DE BIEVRE, 1985). Mendonza e colaboradores já conseguiu em um tempo bem reduzido, de 21 dias, a diferenciação de hifas e conídios em células muriformes, usando um meio quimicamente proposto pelo grupo (MENDONZA; KARUPPAYIL; SZANISZLO, 1993), assim como Da Silva, obtiveram células muriformes semelhantes ao observado no tecido humano em um tempo de 48 horas (DA SILVA, 2009).

#### 4.2. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os pacientes avaliados pertenciam ao sexo masculino e a média de idade era de 74 anos, estes pacientes têm como atividade laboral a lavoura, carpintaria, vigia e aposentados. Mais frequentemente, a CBM ocorre aos 50 a 80 anos, trabalhadores rurais e do sexo masculino, em especial, constituem o principal grupo de pessoas acometidas pela CBM, sendo os principais fatores de risco para a implantação traumática do fungo: a falta de calçados de proteção, luvas ou roupas apropriadas para o serviço associado a manipulação de material vegetal contaminado, uma vez que estes fungos já foram

isolados a partir de vegetais locais no estado do Pará e Maranhão (KONDO et al., 2004; MARQUES et al., 2006; QUEIROZ-TELLES, 2015; SALGADO et al., 2004)

Tabela 1. Características epidemiológicas dos pacientes diagnosticados com CBM atendidos na URE Marcello Candia.

Amostra	Sexo	Idade	Ocupação	Local da lesão	Forma clínica	Agente etiológico
1	--	--	--	--	--	<i>F.monophora</i>
2	M	68	Braçal	perna esquerda	C.L. nodular	nd
3	M	81	Aposentado	perna direita	C.L. nodular	<i>F.pedrosoi</i>
4	M	80	Aposentado	braço esquerdo	C.L em placa	<i>F.pedrosoi</i>
5	M	86	Aposentado	perna esquerda	C.L. nodular	nd
6	M	81	Lavrador	perna direita	C.L. nodular	<i>F.pedrosoi</i>
7	M	70	Aposentado	perna direita	C.L. nodular	<i>F.pedrosoi</i>
8	M	--	ND	ND	C.L. nodular	<i>F.pedrosoi</i>
9	M	77	Lavrador	perna direita	C.L. em placa	<i>F.monophora</i>
10	M	63	Braçal	cotovelo esquerdo	C.L. em placa	<i>F.pedrosoi</i>
11	M	69	Vigia	pé direito	C.L. nodular	<i>F.pedrosoi</i>
12	M	61	Lavrador	Joelho e axila esquerdos	C.L. Difusa	<i>F.pedrosoi</i>

ND: não determinada

O principal agente etiológico encontrado foi *F. pedrosoi* (83,33%) e seguida de *F. monophora* (16,66%), corroborando com os estudos que descrevem esta espécie como o principal agente etiológico da CBM no Brasil e o mais predominante em regiões tropicais, como a Amazônia brasileira (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017), a espécie *F. monophora* é originária de uma análise molecular de isolados de espécies do gênero *Fonsecaea*, embora a maioria deles tenham sido identificados como *F. pedrosoi* (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2012).

A CBM localizada nodular foi a forma clínica mais comum (67%) entre os pacientes, seguida da CBM localizada em placa (25%) e CBM difusa (8%), com predominância de lesões localizadas nos membros inferiores (75%) e em menor número em membros superiores (25%), estes resultados são semelhantes aos encontrados por Araújo (ARAÚJO, 2015), a CBM afeta principalmente os membros superiores, nádegas e membros inferiores em homens, a localização predominante das lesões nos membros

inferiores pode estar correlacionada diretamente com o tipo de atividade desempenhada pelos pacientes, pelo fato dos pés estarem mais expostos ao contato com o material infectado, as lesões também podem aparecer em outras áreas expostas, como mãos, braços, tronco, nádegas, pescoço, antebraços e face mas em menor escala (KONDO et al., 2004; KRZYŚCIAK; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA; PIASZCZYŃSKI, 2014).

### 4.3. SENSIBILIDADE *IN VITRO*

#### 4.3.1. Concentração inibitória mínima

Os testes de sensibilidade *in vitro* foram realizados a partir da norma M38-A2 que padroniza testes de sensibilidade para fungos filamentosos, dermatófitos e demáceos, além da mesma fornecer a diretriz para testes laboratoriais. Vários estudos já foram realizados para testar a sensibilidade *in vitro* de fungos negros, causadores da CBM, porém somente conídios foram utilizados (ANDRADE et al., 2004; CALIGIORNE et al., 1999; CALVO et al., 2011; CARDONA-CASTRO; AGUDELO-FLÓREZ; RESTREPO-MOLINA, 1996; DABOIT et al., 2013; FENG et al., 2012; LI; WAN; LI, 2014; NAJAFZADEH et al., 2010; QUEIROZ-TELLES et al., 1992) em nosso estudo utilizamos tanto conídios quanto células muriformes, aplicando o mesmo método para ambos de *Fonsecaea* spp sem distinção de metodologia, pelo fato de não termos descrito trabalhos de sensibilidade e padronização usando a forma parasitária do fungo negro.

A CIM foi definida como a menor concentração de fármaco que causou inibição do crescimento fúngico visível em placa de microdiluição (CLSI, 2008). A identificação do antifúngico que desempenha melhor ação na inibição dos fungos foi determinada através das CIMs em relação aos diferentes antifúngicos. Observamos uma variação entre conídios e escleróticas nos valores de CIMs para os cinco fármacos testados, que pode estar relacionada a diferenças morfofisiológicas entre essas estruturas fúngicas.

A CIM foi avaliada através da média geométrica das diferentes concentrações de fármacos (CIM<sub>SMG</sub>), CIM<sub>50</sub> e CIMs máxima e mínima dos antifúngicos para conídios, apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de conídios de *Fonsecaea* spp em relação aos antifúngicos através da concentração inibitória mínima.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)					
Amostra fúngica	ITZ	PCZ	VCZ	FCZ	CAS
1	0.5	0.5	0.125	>64	8
2	0.060	0.125	16	32	16
3	0.5	1	0.25	>64	>16
4	2	1	4	>64	4
5	2	1	1	>64	>16
6	1	1	2	>64	>16
7	2	1	1	>64	>16
8	1	0.125	0.06	>64	>16
9	1	1	0.5	>64	>16
10	0.5	1	16	32	16
11	2	1	1	>64	>16
12	0.5	0.5	0.5	>64	4
<b>MG</b>	0.79	0.63	0.57	64	16
<b>MG máx. e min</b>	2 - 0.06	1 - 0.12	4 - 0.06	>64	>16 - 4
<b>CIM<sub>50</sub></b>	1	1	0.75	64	16

MG: Média Geométrica da Concentração Inibitória Mínima, MG máx e MG mín: Média Geométrica máxima e mínima, CFM<sub>50</sub>: a menor concentração do antifúngico capaz de inibir o fungo (50%).

Observando os fármacos isoladamente (tabela 2), o PCZ foi o mais ativo com CIM<sub>MG</sub>= 0.63 µg/mL, com variação entre 0,12 a 1 µg/mL, seguido por VCZ (CIM<sub>MG</sub>=0.57 µg/mL) e ITZ (CIM<sub>MG</sub>=0.79µg/mL). O FCZ apresentou as CIMs mais altas, CIM<sub>MG</sub>= 64 µg/mL, seguido de CAS com CIM<sub>MG</sub>= 16 µg/mL.

Os resultados obtidos corroboram com achados *in vitro* de CARDONA-CASTRO; AGUDELO-FLÓREZ; DENG *et al.*, 2013; NAJAFZADEH *et al.*, 2010; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 1992, onde PCZ demonstrou as menores CIMs, seguido de ITZ e VCZ, para agentes como *C. carrionii* e *F. pedrosoi*, respectivamente, aumentando sua atividade contra esses agentes e sendo uma possível opção de medicamento em casos de difícil manejo. Assim como, fluconazol e caspofungina se mostraram drogas menos ativas nesses testes, confirmando os estudos que afirmam a pouca atividade destes fármacos em agentes da CBM. Daboit *et al.* ao trabalhar com vários agentes etiológicos, como *Fonsecaea* spp, *C.carrionii*, *P.verrucosa*, *R.aquaspersa* e *E. spinifera* destacou o ITZ como melhor agente inibitório em conídios, seguido de VCZ (DABOIT *et al.*, 2013). Li *et al.* e Feng *et al.*, em *P.verrucosa* e isolados de *Cyphellophora* encontraram o PCZ, como fármaco de melhor atividade inibitória, seguido de ITZ e VCZ (FENG *et al.*, 2012; LI; WAN; LI, 2014), corroborando com os nossos achados.

As CIM  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$  são geralmente usadas como um indicador de potencial suscetibilidade à maioria das drogas usadas no tratamento de infecções por fungos dematiáceos (REVANKAR; SUTTON, 2010). Segundo a norma M38-A2 valores altos de CIM do ITZ ( $>8\mu\text{g/mL}$ ) estão associados com resistência clínica a esse agente, entretanto não há dados disponíveis que indiquem uma correlação entre a CIM e o resultado do tratamento com os novos triazólicos; com relação ao FCZ, os fungos filamentosos não são normalmente suscetíveis a fluconazol e a maioria das CIMs são  $> 64\mu\text{g/mL}$  (CLSI, 2008), assim segunda a norma descrita não encontramos amostras que sejam resistentes ao ITZ neste estudo e mais de 90% das amostras foram resistentes ao FCZ.

Com os resultados descritos anteriormente, dividimos os fármacos em dois grupos (figura 10). O grupo 1 formado pelo ITZ, PCZ e VCZ foram os antifúngicos que tiveram melhor atividade (CIMs  $< 1 \mu\text{g/mL}$ ), enquanto que o grupo 2, formado por FCZ e CAS apresentaram baixa atividade (CIMs  $> 11.99 \mu\text{g/mL}$ ), frente aos conídios de *Fonsecaea* spp. A análise estatística entre os grupos mostra uma diferença entre eles com  $p < 0,0001$ .

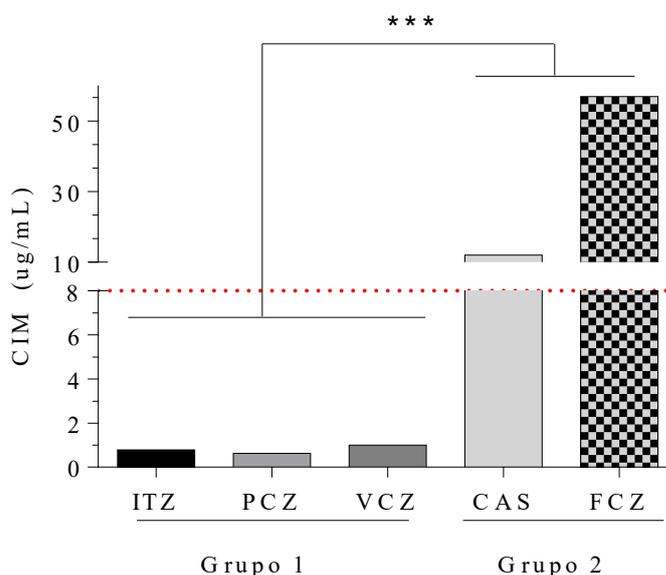


Figura 10. Sensibilidade de conídios de *Fonsecaea* spp para os 5 antifúngicos avaliados, de acordo com CIM. Os grupos 1 e 2 correspondem aos fármacos de melhor atividade e baixa atividade, respectivamente, sendo o grupo 1 o com menores valores de CIM, porém sem diferença estatística entre os fármacos que o compõe. \*\*\*  $p < 0.05$  para Grupo 1 vs Grupo 2, valores expressos média geométrica.

O pilar deste estudo foi avaliar o comportamento das células muriformes frente aos diferentes antifúngicos testados, uma vez que estas estruturas são encontradas no

hospedeiro e responsáveis pelo desenvolvimento das lesões e da doença como um todo (QUEIROZ-TELLES, 2015). A CIM foi avaliada através da média geométrica das diferentes concentrações de fármacos ( $CIM_{MG}$ ),  $CIM_{50}$  e CIMs máxima e mínima dos antifúngicos para células muriformes, apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de células muriformes de *Fonsecaea* spp em relação aos antifúngicos através da concentração inibitória mínima.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)					
Amostra fúngica	ITZ	PCZ	VCZ	FCZ	CAS
1	0.5	1	1	>64	16
2	4	1	2	64	16
3	1	1	0.25	>64	>16
4	4	2	4	>64	4
5	4	1	0.25	-	-
6	4	1	0.25	-	-
7	0.5	1	2	>64	>16
8	4	8	1	>64	16
9	0.5	1	2	>64	>16
10	16	4	4	>64	>16
11	4	1	2	>64	>16
12	1	1	1	>64	>16
<b>MG</b>	1.76	1	1.12	64	16
<b>MG máx. e min</b>	4 - 0.5	1	4 - 0.25	>64	>16 - 16
<b>CIM50</b>	4	1	1.50	64	16

MG: Média Geométrica da Concentração Inibitória Mínima, MG máx e MG mín: Média Geométrica máxima e mínima,  $CFM_{50}$ : a menor concentração do antifúngico capaz de inibir o fungo (50%). ND: Não determinada.

Ao avaliarmos isoladamente os antifúngicos, o PCZ ( $CIM_{MG}=1\mu\text{g/mL}$ ) apresentou melhor atividade, com variação de 4 a 0.25  $\mu\text{g/mL}$ , seguido de VCZ ( $CIM_{MG}=1.12\mu\text{g/mL}$ ) e ITZ ( $CIM_{MG}=1.76\mu\text{g/mL}$ ). O FCZ e CAS não tiveram ação inibitória nas células muriformes, apresentando as maiores CIMs de 64 e 16  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

Até o presente trabalho, não se tinha dados sobre sensibilidade *in vitro* de células muriformes a agentes antifúngicos, em função da dificuldade da indução *in vitro* dessas células, a obtenção desse tipo celular e o teste de sensibilidade realizados abrem as portas para outros estudos sobre a fisiologia das formas patogênicas dos agentes da CBM.

Ainda na análise de CIMs, os antifúngicos, também, foram divididos em dois grupos (figura 11). O primeiro composto pelos fármacos de melhor ação (ITZ, PCZ e

VCZ, com CIMs < 2.1µg/mL) e o segundo os que não tiveram ações sobre as células muriformes (FCZ e CAS, com CIMs > 13.93 µg/mL). A análise estatística entre os grupos mostra uma diferença entre eles com \*\*\* $p < 0.05$ .

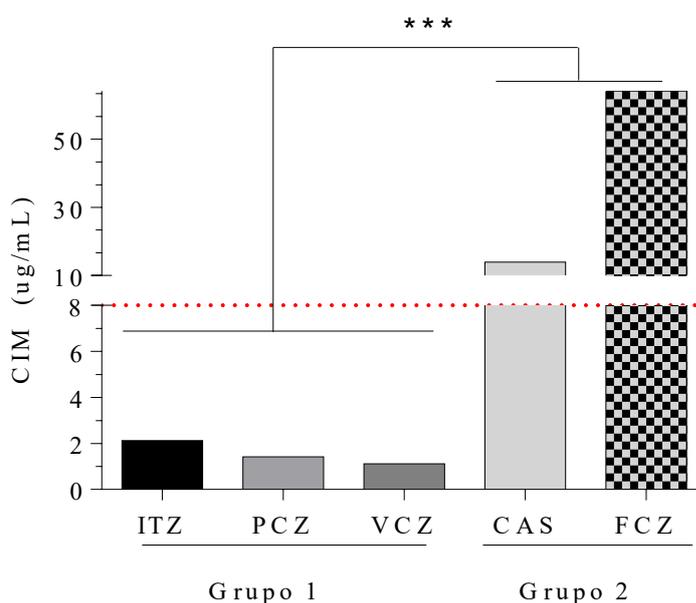


Figura 11. Sensibilidade de células muriformes de *Fonsecaea* spp para os 5 antifúngicos avaliados, de acordo com CIM. Os grupos 1 e 2 correspondem aos fármacos de melhor atividade e baixa atividade, respectivamente, sendo o grupo 1 com menores valores de CIM, porém sem diferença estatística entre os fármacos que o compõe. \*\*\*  $p < 0,0001$  para Grupo 1 vs Grupo 2, valores expressos média geométrica.

Após o conhecimento de qual antifúngico apresentou melhor atividade para as formas fúngicas utilizadas, resolvemos fazer uma comparação de comportamentos entre conídios e células escleróticas para cada antifúngico afim de verificar se há diferença de ação dos fármacos entre as mesmas (figura 12).

Identificamos que o ITZ exerce atividade inibitória sobre a células muriformes somente quando em concentrações maiores as efetivas em conídios, com  $*p < 0.05$  (figura 12), diferente do que observamos para o PCZ e VCZ, que não apresentaram diferença estatística.

Em estudos *in vitro* com conídios, o VCZ apresentou baixas CIMs contra isolados de *Fonsecaea* spp e *C. carrionii* (BIANCALANA, 2011; DENG et al., 2013; NAJAFZADEH et al., 2010; VITALE; PEREZ-BLANCO; HOOG, 2009).

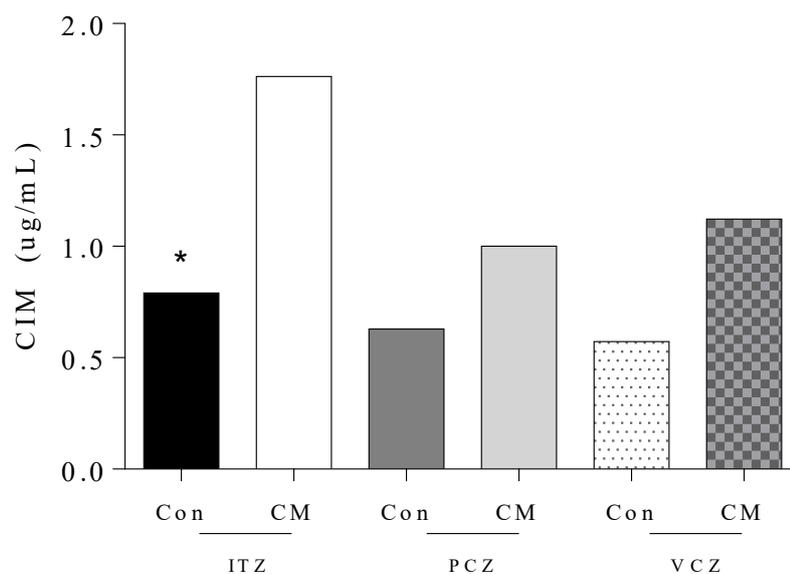


Figura 12. Comparação da sensibilidade de células muriformes e conídios, através da CIM, para ITZ, PCZ e VCZ.  $p < 0.05$  para  $ITZ_{CM}$  vs  $ITZ_{Con}$  e sem diferença estatística no PCZ e VCZ.

#### 4.3.2. Concentração fungicida mínima

Os resultados obtidos com CIM nos permitiu inferir a ação de inibição dos antifúngicos sobre as diferentes formas de *Fonsecaea* spp e após isso realizamos os testes para verificar a CFM de cada agente antifúngico, que foi definida como a menor concentração de fármaco a partir da qual nenhuma colônia era visível na placa de ágar (CLSI, 2008).

A CFM está representada em valores de média geométrica das diferentes concentrações de fármacos ( $CIM_{SMG}$ ),  $CIM_{50}$  e CIMs máxima e mínima dos antifúngico para conídios, descrita na tabela 4.

Tabela 4. Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de conídios de *Fonsecaea* spp em relação aos antifúngicos, concentração fungicida mínima.

Amostra fúngica	Concentração Fungicida Mínima (CFM)				
	ITZ	PCZ	VCZ	FCZ	CAS
1	>16	>16	>16	>64	>16
2	0.5	0.12	16	32	>16
3	>16	>16	>16	>64	>16
4	>16	8	>16	>64	>16
5	>16	8	8	>64	>16
6	>16	8	>16	>64	>16
7	>16	>16	>16	>64	>16
8	>16	>16	16	>64	>16
9	>16	16	>16	>64	>16
10	>16	8	>16	>64	>16
11	>16	8	16	>64	>16
12	>16	2	16	>64	>16
MG	16	6.72	16	64	16
MG máx. e min	>16	>16 - 0.12	>16 - 16	>64	>16
CIM <sub>50</sub>	16	8	16	64	16

MG: Média Geométrica da Concentração Fungicida Mínima, MG máx e MG mín: Média Geométrica máxima e mínima, CFM<sub>50</sub>: a menor concentração do antifúngico capaz de inibir o fungo (50%).

Quando avaliamos isoladamente os fármacos, o PCZ (CIM<sub>MG</sub> 6.72 µg/mL) apresentou melhor atividade neste parâmetro para conídios, com variação de 0.12 a >16 µg/mL, seguido de ITZ (CIM<sub>MG</sub> 16µg/mL) e VCZ (CIM<sub>MG</sub> 16µg/mL), com diferença estatística de  $p < 0.05$  (figura 13), em 66,6% das amostras fúngicas o PCZ teve uma ação fungicida quando comparado com ITZ e VCZ que em mais de 50% das amostras tiveram ação fungistática. Diferente de nossos achados, VITALE *et al.* encontraram o ITZ seguido do VCZ como melhores antifúngico fungicidas contra conídios de outro agente da CBM, o *Cladophialophora* spp, segundo o parâmetro da CFM (VITALE; PEREZ-BLANCO; HOOG, 2009).

O FCZ e CAS não apresentaram ação sobre os fungos, com CFMs mais altas de 64 e 16 µg/mL, respectivamente, confirmando que estes fármacos não exercem ação fungicida sobre os conídios ( $p > 0.05$ ), assim como em outros estudos o FCZ não teve ação fungicida em espécies de *Cladophialophora* spp, com CFM<sub>MG</sub> = 36.16µg/mL (VITALE; PEREZ-BLANCO; HOOG, 2009), a CAS é um antifúngico da classe das equinocandinas que apresentou valores altos para as variáveis avaliadas descartando o seu uso como opção de tratamento da CBM, uma vez que estudos anteriores já demonstraram a baixa atividade deste fármaco sobre agentes da CBM (ARAÚJO, 2015; DENG *et al.*, 2013; NAJAFZADEH *et al.*, 2010).

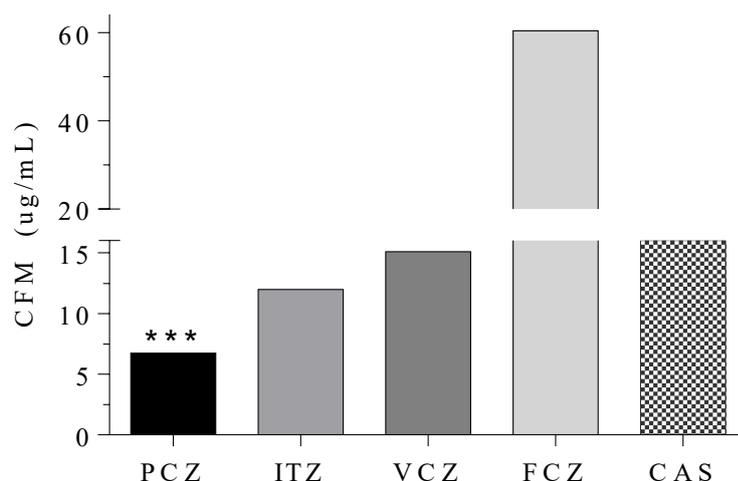


Figura 13. Sensibilidade de conídios de *Fonsecaea* spp para os 5 antifúngicos avaliados, de acordo com CFM, valores expressos em média geométrica.  $p < 0.05$  para ITZ vs PCZ vs VCZ vs FCZ vs CAS e  $p < 0.05$  PCZ vs ITZ e VCZ.

A CFM está representada em valores de média geométrica das diferentes concentrações de fármacos ( $CIM_{SMG}$ ),  $CIM_{50}$  e  $CIM$ s máxima e mínima dos antifúngico para células muriformes, apresentada na tabela 5.

Tabela 5. Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de células muriformes de *Fonsecaea* spp em relação aos antifúngicos, concentração fungicida mínima.

Concentração Fungicida Mínima (CFM)					
Amostra fúngica	ITZ	PCZ	VCZ	FCZ	CAS
1	0.5	16	>16	>64	>16
2	>16	1	4	>64	>16
3	>16	16	>16	>64	>16
4	>16	>16	>16	>64	>16
5	4	1	16	-	-
6	4	1	16	-	-
7	>16	16	>16	>64	>16
8	>16	16	16	>64	>16
9	>16	4	>16	>64	>16
10	>16	8	>16	>64	>16
11	>16	16	>16	>64	>16
12	>16	16	>16	>64	>16
<b>MG</b>	16	6.72	16	64	16
<b>MG máx. e min</b>	16	>16 – 1	>16- 16	>64	>16
<b><math>CIM_{50}</math></b>	16	16.00	16	64	16

MG: Média Geométrica da Concentração Fungicida Mínima, MG máx e MG mín: Média Geométrica máxima e mínima,  $CFM_{50}$ : a menor concentração do antifúngico capaz de matar o fungo (50%) d. ND: Não determinada.

Os resultados obtidos mostram o PCZ ( $CFM_{MG}$  6.73  $\mu\text{g/mL}$ ) como antifúngico de melhor atividade contra as células muriformes, em mais de 90% das amostras este fármaco teve ação fungicida para células muriformes, seguido de ITZ ( $CIM_{MG}$  16 $\mu\text{g/mL}$ ) e VCZ ( $CIM_{MG}$  16 $\mu\text{g/mL}$ ) e que ambos tiveram uma ação fungistática em

mais de 50% das amostras, com diferença estatística de  $p < 0.05$  entre todos os fármacos (figura 14).

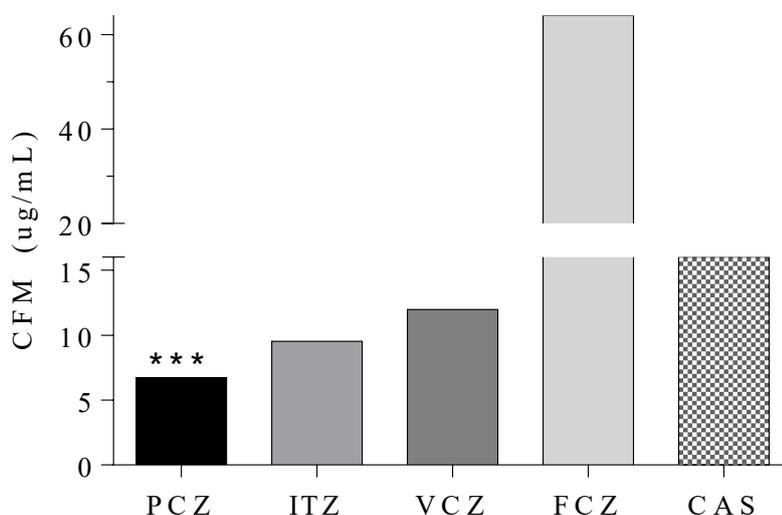


Figura 14. Sensibilidade de células muriformes de *Fonsecaea* spp para os 5 antifúngicos avaliados, de acordo com CFM, valores expressos em média geométrica.  $p < 0.05$  para ITZ vs PCZ vs VCZ vs FCZ vs CAS e  $p < 0.05$  PCZ vs ITZ e VCZ.

Na classe dos triazóis, existem agora os azóis de amplo espectro, de terceira geração, o VCZ, PCZ e ISA. Os méritos desses novos azóis são substanciais, pois melhoraram a atividade antifúngica, a segurança, a farmacocinética e as formulações. Eles são um componente chave do atual manejo clínico de micoses invasivas como agentes antifúngicos de amplo espectro para uso na profilaxia e preventivas, estratégias empíricas e terapêuticas (PERFECT, 2017).

Em função dos resultados mostrados na literatura, os triazóis já vêm sendo utilizados no tratamento da CBM, em baixa escala, especialmente pela limitação de orçamento das secretarias de saúde ou dos pacientes que são de baixa renda (AMEEN, 2010; DENG *et al.*, 2013; NAJAFZADEH *et al.*, 2010). O PCZ já tem sido usado em infecções causadas por outros fungos negros, tais como as espécies de *Exophiala*, e foi eficaz em alguns casos causados por *F. pedrosoi*, refratários a outras terapias, em outras espécies como *C. carrionii*, seu uso ainda não foi comprovado (NEGRONI *et al.*, 2004, 2005; VITALE; PEREZ-BLANCO; HOOG, 2009).

Os ensaios de atividade antifúngica são úteis para detectar a resistência que pode surgir durante o tratamento e prever a resposta clínica (ANDRADE *et al.*, 2004; DABOIT *et al.*, 2012; GONZAGA DE OLIVEIRA *et al.*, 1975), embora o manejo da CBM consista em tempos prolongados de tratamento com antifúngicos, que podem ser combinadas aos tratamentos físicos, ainda há poucas opções de antifúngico disponíveis

hoje. Dentre as drogas antifúngicas utilizadas no tratamento da CBM, destaca-se o uso de ITZ e TRB isoladamente ou em combinação, PSZ e VRZ, todos esses agentes estão associados a efeitos adversos significativos e requerem monitoramento funções hepáticas e renais (AMEEN, 2010; FADER; MCGINNIS, 1988).

Alguns estudos já demonstraram que o uso prolongado do PCZ apresentou um perfil de segurança comparável ao uso em curto prazo (CACCIAPUOTI et al., 2000), além de um perfil de segurança e tolerabilidade semelhantes, em comparação com o fluconazol, durante o tratamento da candidíase orofaríngea, sendo de suma importância, porque a segurança, a tolerabilidade e a biodisponibilidade oral deste fármaco são fatores que contribuem para o seu uso a longo prazo bem-sucedido na profilaxia ambulatorial prolongada ou tratamento de infecções fúngicas invasivas, justificando seu uso em tais condições (COURTNEY et al., 2003, 2005). Quanto ao VCZ tem eficácia comprovada para muitas infecções fúngicas, mas o possível desenvolvimento de toxicidade hepática relacionada ao nível sérico, sendo uma preocupação de segurança (DENNING et al., 2002; PERFECT et al., 2003).

## 5. CONCLUSÕES

As amostras fúngicas apresentaram tempos distintos, de 5 a 14 dias, para diferenciar seus conídios em células muriformes, portanto acreditamos que apesar de pertencerem ao mesmo gênero os fungos apresentam particularidades fisiológicas ainda desconhecidas que possam influenciar neste processo e com isso há necessidade de outros estudos para avaliação.

Nos testes de suscetibilidade *in vitro*, o PCZ teve as menores concentrações inibitórias e fungicidas tanto em conídios quanto em células muriformes, mostrando-se como uma potencial escolha para o tratamento da CBM, com isso investir em testes de suscetibilidade foi impor importante para identificar cepas sensíveis ou resistente.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVIANO, C. S. et al. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. **Mycopathologia**, v. 119, n. 1, p. 17–23, 1992.
- ALVIANO, D. S. et al. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 10, p. 689–695, 2003.
- AMEEN, M. Managing chromoblastomycosis. **Tropical Doctor**, v. 40, n. April, p. 65–67, 2010.
- ANDRADE, T. S. T. S. et al. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. **Mycoses**, v. 47, n. 5–6, p. 216–221, jun. 2004.
- ARAÚJO, D. P. DE. Avaliação in vitro da suscetibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos de *Fonsecaea* spp na região amazônica Avaliação in vitro da suscetibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos de *Fonsecaea* spp na região amazônica. 2015.
- BIANCALANA, F. **Avaliação da suscetibilidade de hifas e conídios de fungos demáceos frente aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e voriconazol e terbinafina, e a última em combinação com os demais antifúngicos.**, 2011.
- BONIFAZ TRUJILLO, J. A. **Micología Médica Básica**. 4ª ed. [s.l: s.n.].
- CACCIAPUOTI, A. et al. In vitro and in vivo activities of SCH 56592 (posaconazole), a new triazole antifungal agent, against *Aspergillus* and *Candida*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 8, p. 2017–2022, ago. 2000.
- CALIGIORNE, R. B. et al. In vitro susceptibility of chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis agents to antifungal drugs. **Medical Mycology**, v. 37, n. 6, p. 405–409, 1999.
- CALVO, E. et al. Antifungal therapy in an athymic murine model of chromoblastomycosis by *Fonsecaea pedrosoi*. **Antimicrobial agents and**

**chemotherapy**, v. 55, n. 8, p. 3709–13, ago. 2011.

CARDONA-CASTRO, N.; AGUDELO-FLÓREZ, P.; RESTREPO-MOLINA, R. Chromoblastomycosis murine model and in vitro test to evaluate the sensitivity of *Fonsecaea pedrosoi* to ketoconazole, itraconazole and saperconazole. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 779–784, 1996.

CARRIÓN, A. L. CHROMOBLASTOMYCOSIS. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 50, n. 10, p. 1255–1282, 1 set. 1950.

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

CHANG, Y. L. et al. **New facets of antifungal therapy** Virulence, 2017.

CLSI. M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard—Second Edition. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, v. 28, n. 16, p. 29, 2008.

CORNELY, O. A. et al. Posaconazole vs. Fluconazole or Itraconazole Prophylaxis in Patients with Neutropenia. v. 4, 2007.

COURTNEY, R. et al. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of oral posaconazole administered in single and multiple doses in healthy adults. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 9, p. 2788–95, set. 2003.

COURTNEY, R. et al. Posaconazole Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability in Subjects With Varying Degrees of Chronic Renal Disease. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 45, n. 2, p. 185–192, fev. 2005.

CUNHA, M. M. L. et al. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 80, 16 out. 2010.

DA SILVA, J. P. et al. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: Ultrastructure and antigenicity. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 63–69, 2002.

DA SILVA, J. P. et al. Phagocytosis of *Fonsecaea pedrosoi* conidia, but not sclerotic cells caused by Langerhans cells, inhibits CD40 and B7-2 expression. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 104–111, 2007.

DA SILVA, M. B. et al. Development of natural culture media for rapid induction of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells in vitro. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 11, p. 3839–3841, 2008.

DA SILVA, M. B. Indução de escleróticas in vitro e análise da resposta imune dos pacientes de cromoblastomicose em tratamento com itraconazol. p. 70, 2009.

DABOIT, T. C. et al. A case of *Exophiala spinifera* infection in Southern Brazil: Molecular identification and antifungal susceptibility. **Medical Mycology Case Reports**, v. 1, n. 1, p. 72–75, 2012.

DABOIT, T. C. et al. In vitro susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and to the combination of terbinafine and amphotericin B. **Mycoses**, v. 57, n. 2, p. 116–120, 2013.

DE HOOG, G. S. et al. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 38 Suppl 1, n. 769171546, p. 243–250, 2000.

DE HOOG, G. S. et al. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 42, n. 5, p. 405–416, 2004.

DENG, S. et al. In vitro antifungal susceptibility of *Cladophialophora carrionii*, an agent of human chromoblastomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1974–1977, abr. 2013.

DENNING, D. W. et al. Efficacy and Safety of Voriconazole in the Treatment of Acute Invasive Aspergillosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 563–571, 1 mar. 2002.

EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 931–940, fev. 2012.

- ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of In vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2950–6, out. 1998.
- ESTERRE, P.; QUEIROZ-TELLES, F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. **Current opinion in infectious diseases**, v. 19, n. 2, p. 148–152, 2006.
- FADER, R. C.; MCGINNIS, M. R. Infections caused by dematiaceous fungi: chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 2, p. 925–938, 1988.
- FENG, P. et al. In Vitro activities of nine antifungal drugs against 81 Phialophora and Cyphellophora isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 6044–6047, nov. 2012.
- FRANZEN, A. J. et al. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. **Journal of Structural Biology**, v. 162, n. 1, p. 75–84, 2008.
- GARNICA, M.; NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F. Difficult mycoses of the skin: advances in the epidemiology and management of eumycetoma, phaeohyphomycosis and chromoblastomycosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 22, n. 6, p. 559–563, 2009.
- GIRMENIA, C. New generation azole antifungals in clinical investigation. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 18, n. 9, p. 1279–1295, 14 set. 2009.
- GOMES, R. R. et al. Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, p. 1–20, 2016.
- GONZAGA DE OLIVEIRA, L. et al. In vitro sensitivity to 5-fluorocytosine of strains isolated from patients under treatment for chromomycosis. **International journal of dermatology**, v. 14, n. 2, p. 141–3, mar. 1975.
- GREER, N. D. Voriconazole: the newest triazole antifungal agent. **Proceedings**

(**Baylor University. Medical Center**), v. 16, n. 2, p. 241–8, abr. 2003.

IBRAHIM-GRANET, O.; GUÉCHO, E.; DE BIEVRE, C. Induction of yeast-like cells in a strain of *Fonsecaea pedrosoi* cultured under very acid condition. **Mycopathologia**, v. 90, p. 35–39, 1985.

KIM, J. H.; WILLIAMS, K. Posaconazole Salvage Treatment for Invasive Fungal Infection. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3–4, p. 259–265, 8 out. 2014.

KOFLA, G.; RUHNKE, M. Pharmacology and Metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis – Review of the literature. **European Journal of Medical Research**, v. 16, p. 159–166, 2011.

KOHLER, S. et al. Comparison of the echinocandin caspofungin with amphotericin B for treatment of histoplasmosis following pulmonary challenge in a murine model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1850–4, jul. 2000.

KONDO, M. et al. A case of chromomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* and a review of reported cases of dematiaceous fungal infection in Japan. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 48, n. 2, p. 85–89, 2004.

KRZYŚCIAK, P. M.; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, M.; PIASZCZYŃSKI, M. Chromoblastomycosis. **Postępy dermatologii i alergologii**, v. 31, n. 5, p. 310–21, 2014.

LEÃO, R. N. Q. DE et al. Medicina tropical e infectologia na Amazônia. v.2. 2013.

LETSCHER-BRU, V.; HERBRECHT, R. Caspofungin: The first representative of a new antifungal class. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 513–521, 2003.

LI, Y.; WAN, Z.; LI, R. In vitro activities of nine antifungal drugs and their combinations against *Phialophora verrucosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5609–5612, 2014.

MARQUES, S. G. et al. Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella aquaspersa*. **Medical mycology**, v. 42, n. 3, p. 261–5, jun. 2004.

MARQUES, S. G. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon Region of Maranhão Brazil. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 47, n. 4, p. 305–311, 2006.

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

MATSUMOTO, T. et al. **Critical Review of Human Isolates of Wangiella dermatitidis on JSTOR**. Disponível em:

<<http://www.jstor.org/stable/3793099?origin=crossref>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

MAZU, T. K. et al. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. **Mini Rev Med Chem**, v. 16, n. 7, p. 555–578, 2016.

MCGINNIS, M. R. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 1983.

MCKEAGE, K. **Posaconazole: A review of the gastro-resistant tablet and intravenous solution in invasive fungal infections** **Drugs**, 17 mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25595699>>. Acesso em: 16 jun. 2018

MENDONZA, L.; KARUPPAYIL, S. M.; SZANISZLO, P. J. Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi.pdf. **Mycoses**, p. 157–164, 1993.

NAJAFZADEH, M. J. et al. In vitro activities of eight antifungal drugs against 55 clinical isolates of *Fonsecaea* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 1636–1638, 2010.

NAJAFZADEH, M. J. et al. Molecular epidemiology of *Fonsecaea* species. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 464–469, 2011.

NEGRONI, R. et al. Case Study: Posaconazole Treatment of Disseminated Phaeohyphomycosis Due to *Exophiala spinifera* and Phaeohyphomycosis Due to *Exophiala spinifera*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 3, p. e15–e20, 1 fev. 2004.

NEGRONI, R. et al. Posaconazole treatment of refractory eumycetoma and

chromoblastomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 47, n. 6, p. 339–346, 2005.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. **Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications****Infectious Disease Clinics of North America**Elsevier, , 1 mar. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891552015001014?via%3Dihub>>. Acesso em: 16 jun. 2018

PEREZ-BLANCO, M. et al. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcon State, Venezuela. **Med Mycol**, v. 44, n. 5, p. 467–471, 2006.

PERFECT, J. R. et al. Voriconazole Treatment for Less-Common, Emerging, or Refractory Fungal Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 9, p. 1122–1131, 2003.

PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: A reality check. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 9, p. 603–616, 2017.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Itraconazole in the treatment of Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. **International Journal of Dermatology**, v. 31, n. 11, p. 805–812, 1992.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 47, n. 1, p. 3–15, 2009.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 49, n. 3, p. 225–236, 2011.

QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis: a Neglected Tropical Disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57 Suppl 1, n. 1, p. 46–50, 2015.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Chromoblastomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**,

v. 30, n. 1, p. 233–276, 2017.

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

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D.; AZEVEDO, C. Fungal Infections of Implantation (Chromoblastomycosis, Mycetoma, Entomophthoromycosis, and Lacaziosis). In: **Diagnosis and Treatment of Fungal Infections**. Cham: Springer International Publishing, 2008. p. 261–276.

REVANKAR, S. G. AND D. A. S.; SUTTON, D. A. Melanized Fungi in Human Disease Sanjay. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 24, n. 2, p. 884–928, 1 out. 1986.

REVANKAR, S. G.; SUTTON, D. A. **Melanized fungi in human disease** **Clinical Microbiology Reviews**, 2010.

ROEMER, T.; KRYSAN, D. J. **Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches** **Cold Spring Harbor perspectives in medicine** Cold Spring Harbor Laboratory Press, , 1 maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24789878>>. Acesso em: 16 jun. 2018

SALGADO, C. et al. **Processo para a preparação de meios de culturas naturais e fabricação de um meio quimicamente definido para alterações morfológicas e crescimento de microorganismos** Brasil, 2008.

SALGADO, C. G. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 46, n. 1, p. 33–36, 2004.

SALGADO, C. G. et al. Cutaneous diffuse chromoblastomycosis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 8, p. 528, 2005.

SALGADO, C. G. et al. Cutaneous localized annular chromoblastomycosis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 36, n. 2, p. 257–261, 2009.

SANTOS, A. L. S. et al. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major

etiologic agent of chromoblastomycosis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 5, p. 570–591, 2007.

SILVA, J.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). **Mycopathologia**, v. 143, p. 171–175, 1999.

SILVA, M. The Parasitic Phase of the Fungi of Chromoblastomycosis: Development of Sclerotic Cells in vitro and in vivo. **Mycologia**, v. 49, n. 3, p. 318, maio 1957.

SUN, J. et al. Molecular characterization of pathogenic members of the genus *Fonsecaea* using multilocus analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–10, 2012.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 4, p. 403–408, 2012.

VITALE, R. G.; PEREZ-BLANCO, M.; HOOG, G. S. In vitro activity of antifungal drugs against *Cladophialophora* species associated with human chromoblastomycosis. **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. 35–40, 1 jan. 2009.

WALKER, S. S. et al. Discovery of a novel class of orally active antifungal  $\beta$ -1,3-D-glucan synthase inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5099–5106, 2011.