UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE AGENTES
CAUSADORES DE CROMOBLASTOMICOSE FRENTE A
DIFERENTES ANTIFÚNGICOS**

TÂNIA SUELI DE ANDRADE

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Prof.^a Assoc. Arlete Emily Cury

São Paulo

1999

DEDALUS - Acervo - CQ

30100002451

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S553s Andrade, Tânia Sueli de
Suscetibilidade *in vitro* de agentes causadores de
cromoblastomicose frente a diferentes antifúngicos / Tânia
Sueli de Andrade. -- São Paulo, 1999.
121p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Cury, Arlete Emily

1. Micologia médica 2. Terapêutica I. T. II. Cury, Arlete
Emily, orientador.

616.969 CDD

TÂNIA SUELI DE ANDRADE

**SUSCETIBILIDADE IN VITRO DE AGENTES CAUSADORES DE
CROMOBLASTOMICOSE FRENTE A DIFERENTES
ANTIFÚNGICOS**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Prof.^a Assoc. Arlete Emily Cury

Presidente / Orientador

Dr.^a Marcia de Souza Carvalho Melhem

1^o Examinador

Prof.^a Dr.^a Elza Mamizuka

2^o Examinador

São Paulo, 20 de dezembro de 1999

À Deus

Ao meu grande amor, Ricardo

Aos meus pais, Salete e Anísio, meu irmão Fábio e minha avó Anna,
Pelo apoio, amor e carinho que sempre me dedicaram.

Agradecimentos

Ao Ricardo, pela paciência, colaboração e carinho.

À Prof^a. Arlete Emily Cury, mentora, cujos conhecimentos, sugestões, ensinamentos e orientação tornaram possível o presente trabalho e, também, pela paciência amizade e carinho.

As amigas Soninha e Gislaine do laboratório de Micologia e Parasitologia Clínicas FCF-USP, pela valiosa colaboração na execução dos trabalhos, aprendizado, apoio, amizade e carinho com que me acolheram no laboratório.

À amiga Viviane do laboratório de Micologia e Parasitologia Clínicas FCF-USP, pelo apoio e valiosa colaboração na execução dos trabalhos e amizade.

Aos professores da disciplina de Micologia e Parasitologia Clínicas FCF-USP, Herminia Kanamura, Marisa P. M. Hirschfeld, Paulo S. Minami, pelo apoio, colaboração e atenção.

À Dr^a. Marcia de Souza Carvalho Melhem, amiga, pelo incentivo, aprendizado, colaboração, amizade e carinho, que me acompanham desde o início da minha carreira científica.

Aos amigos e colaboradores do Instituto Adolfo Lutz, Sandra, Walderez, Andrez, Roberto (seção de fotomicrografia) e toda a brilhante equipe de micologistas desta seção, pelo apoio, colaboração e carinho com que me recebem durante todos estes anos.

À equipe da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da USP, em especial ao Dr. Luiz Guilherme Martins de Castro e Ricardo Spina Nunes, pela valiosa colaboração nos trabalhos, apoio e amizade.

Ao Prof. Carlos da Silva Lacaz, pela colaboração e acima de tudo pelo grande trabalho desenvolvido em sua jornada micológica com amor e dedicação admiráveis.

À equipe do laboratório de micologia do Instituto de Medicina Tropical, Mônica, Elisabeth e Natalina, pelo apoio e colaboração em diversas fases deste trabalho.

À amiga Gilda Del Negro, pelo seu apoio, carinho e colaboração em grande parte deste trabalho.

Ao amigo Mauro Cintra Giudice, pela aprendizagem, apoio, carinho e amizade que sempre me acompanha.

Aos amigos e colaboradores, Almir do Núcleo de Gestão Assistencial de Registro, Marilene da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e Maria do Carmo do Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba, pela colaboração.

À Prof^a. e amiga Maria Magali S. R. Soares, pela iniciação no mundo dos fungos, do qual não quero mais sair.

As colegas do laboratório de Micologia e Parasitologia Clínicas FCF-USP, Leila, Valdirene, Eliane, pelo apoio e amizade.

As secretárias Marcia, Sueli, Sofia, Bene, Elaine e também ao Jorge, pela orientação, paciência e amizade.

As funcionárias do Departamento de Análises Clínicas, Marli, Cláudia, D. Maria, Dorlei, Carmem e Rose, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	página
I INTRODUÇÃO	01
1. Aspectos históricos	02
2. Epidemiologia	05
3. Etiologia	06
4. Aspectos clínicos	07
5. Diagnóstico laboratorial	08
5.1. Exame direto	08
5.2. Cultura	09
6. Prognóstico e terapia	10
II PROPRIEDADES GERAIS DOS ANTIFÚNGICOS	13
1. Aspectos químicos e farmacológicos	15
1.1. Anfotericina B	15
1.2. 5-Fluorocitosina	21
1.3. Terbinafina	24
1.4. Cetoconazol	27
1.5. Fluconazol	32
1.6. Itraconazol	35
III DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DOS ANTIFÚNGICOS IN VITRO	39
IV PROPOSIÇÃO E OBJETIVOS	45
V MATERIAL E MÉTODOS	47
1. Pacientes	48
2. Microrganismos	48
3. Exames micológicos	49
3.1. Exame direto	49
3.2. Cultura	49
4. Padronização do inóculo	49
5. Drogas	50
6. Meios de cultura e soluções	51
6.1. Ágar Sabouraud Dextrose	51
6.2. Ágar Sabouraud com cloranfenicol	51
6.3. Mycobiotic agar	51
6.4. Ágar batata	51

6.5. Caldo Yeast Nitrogen Base - tamponado.....	52
6.6. Tampão de fosfato (>0,01M).....	52
6.7. Meio de reserva.....	52
6.8. Ágar tampão de fosfato.....	53
6.9. Tampão de fosfato com Tween 80.....	53
6.10 Tampão de fosfato (0,01M).....	54
7. Antifungigrama.....	54
7.1. Diluição das drogas.....	54
7.2. Inóculo.....	55
7.3. Execução do teste de Concentração Inibitória Mínima.	56
7.4. Execução do teste Concentração Fungicida Mínima....	57
7.5. Interpretação dos resultados.....	57
VI RESULTADOS.....	58
VII DISCUSSÃO.....	72
VIII CONCLUSÃO.....	86
IX RESUMO.....	89
X REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

I – INTRODUÇÃO

Cromoblastomicose é uma doença causada por fungos da família dematiaceae, limitando-se a pele e tecido subcutâneo. Usualmente, a aquisição da micose se dá através de traumatismos com plantas ou objetos que veiculam os agentes etiológicos^{2,76,96}. Recentemente, pesquisadores da Venezuela relataram caso raro de aquisição por picada de inseto¹⁴⁷. Em geral, é de evolução lenta, tornando-se crônica, existindo pacientes com 40 anos de doença^{2,24}. Muitos desses pacientes demoram a procurar o serviço de saúde e, quando o fazem, a infecção encontra-se em estágio avançado de difícil tratamento. Além disso, alguns desses pacientes já estão impossibilitados de trabalhar, tamanho o comprometimento dos membros. Geralmente, a doença apresenta-se sob a forma de nódulos ou verrugas que podem ulcerar^{2,76,96}. Ao exame histopatológico é caracterizada por hiperqueratose, hiperplasia pseudo-hepteliomatosa e formação de microabscessos queratinofílicos na epiderme⁷⁶, sendo confirmada por meio de exames micológicos pela presença de células muriformes nos tecidos pesquisados. Segundo McGinnis⁹⁶, essas características definem o quadro de cromoblastomicose.

Outras micoses, como feo-hifomicose e eumicetomas, também podem ser causadas por agentes da cromoblastomicose¹⁴⁸, sendo, portanto, as características supra citadas importantes para o diagnóstico diferencial das micoses⁹⁶.

1. Aspectos históricos

A maioria dos livros textos credits a primeira publicação de cromoblastomicose a Lane e Medlar em 1915^{24,25}. Estes autores, descreveram aspectos clínicos de dermatite verrucosa em um jovem italiano que morava em Boston⁷⁸. Publicação posterior de Medlar referia-se a morfologia do fungo em cortes histológicos e em cultura. Thaxter, que colaborou nesse último trabalho, classificou o fungo como *Phialophora verrucosa* criando, assim, um novo gênero e uma nova espécie¹⁰⁴. A cromoblastomicose, porém, já havia sido observada no Brasil, em 1911; a

partir de material obtido por biópsia de paciente com dermatite verrucosa, proveniente do Estado de Goiás, Alexandrino Pedroso comprovou a presença de corpos esféricos demácios, no interior de células gigantes e isolou um fungo demácio em cultura⁷⁶. No entanto, essa ocorrência, juntamente com outras três, só foram publicadas por Pedroso e Gomes em 1920, considerando os fungos isolados como sendo semelhantes ao encontrado em Boston, ou seja, *Phialophora verrucosa*¹¹⁸.

Em 1914, Rudolph, descreveu uma doença que chamou de "figueira". Mais tarde, verificou-se que se tratava do primeiro caso de cromoblastomicose descrito na literatura¹⁴⁰. Os casos relatados, por esse autor, no Estado de Minas Gerais, eram clínica e micologicamente similares ao relatado por Pedroso. Em 1922, Brumpt¹⁷ questionou a identificação dos agentes descritos por Pedroso e Gomes, considerando-os diferentes dos observados pelos americanos em 1915. Deste modo, denominou os fungos isolados no Brasil de *Hormodendrum pedrosoi*, baseando-se na ramificação dos conídios em cadeia para dar nome ao gênero e homenageando Pedroso para dar nome a espécie. Ainda em 1922, outras ocorrências da micose foram diagnosticadas no Brasil por Terra, Torres, Fonseca e Area Leão¹⁶⁶.

O primeiro caso confirmado de cromoblastomicose, fora do continente americano, foi relatado em 1927 por Montpellier e Catanei¹⁰⁸. Os autores, descreveram a ocorrência da micose na Nigéria e denominaram o agente etiológico de *Hormodendrum algeriensis*, atualmente considerado sinônimo de *Fonsecaea pedrosoi*. Em 1929, casos na Polônia e Sumatra também foram descritos^{2,18}. Durante os anos seguintes, vários relatos da doença foram publicados, tanto no continente americano, como em outros^{2,18}. Em 1935, a partir de um caso ocorrido em Porto Rico, Càrrion²² verificou que o fungo isolado era diferente dos observados anteriormente, relatando, então, uma nova espécie, *Hormodendrum compactum*. Em 1936, Negroni¹¹² estudando um fungo isolado de um paciente na Argentina, verificou dois tipos de esporulação: hormodendrum ("tipo Cladosporium") e acrotheca ("tipo Fonsecaea"); assim, criou um novo gênero, denominado *Fonsecaea* para que pudesse incluir os dois tipos de esporulação, identificando o fungo

como *Fonsecaea pedrosoi*. Posteriormente, Kano⁷³ descreveu o primeiro caso no Japão e um novo agente, *Hormiscium dermatitidis*, atualmente conhecido como *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. Trejos¹⁶⁶, em 1954, renomeou um fungo, isolado na Venezuela, de *Fonsecaea pedrosoi* variedade *Cladosporium* para uma nova espécie, *Cladosporium carionii*. Em 1972, Borelli¹⁴ isolou um agente diferente dos descritos anteriormente em casos de cromoblastomicose, nomeando-o de *Acrotheca aquaspersa*; mais tarde, juntamente com Shell e McGinnis redefiniu o gênero para *Rhinocladiella*¹⁴⁹.

Desde a descoberta da cromoblastomicose, várias terminologias foram utilizadas para definir a doença e seus agentes. Entre elas, podemos citar: figueira, dermatite verrucosa, formigueiro, cromoblastomicose, dermatite verrucosa cromomycótica, dermatite verrucosa blastomycótica, doença de Pedroso, doença de Fonseca, doença de Gomes^{2,76}. O termo cromoblastomicose foi introduzido em 1922, por Terra¹⁶⁶, e foi aceito pela maioria dos micologistas da época. Entretanto, essa nomenclatura apresentava algumas impropriedades, como indicação de presença de elementos coloridos (chromo) na figura clínica e brotamentos (blasto) nas células do agente etiológico no tecido, o que não era observado na micose¹. O termo cromomycose foi criado posteriormente por Moore e Almeida¹⁰⁹, em 1935, e foi muito utilizado nas décadas de 60 e 70². Atualmente, cromoblastomicose é a terminologia indicada pela *International Society for Human and Animal Mycology*¹¹³, mas, principalmente no Brasil, muitos micologistas discordam desta indicação, preferindo o termo cromomycose^{23,76}. A configuração do agente em vida parasitária também tem sofrido controvérsias; várias denominações já foram utilizadas: corpos escleróticos e corpos fumagóides, mas, células muriformes tem sido a mais empregada^{93,96}.

Durante todos esses anos, vários casos de micoses causadas por fungos demácios foram confundidos com cromoblastomicose e relatados como tal, destacando-se, neste contexto, a feo-hifomicose⁹⁶. Em 1974, Ajello¹ definiu feo-hifomicose e, com base nesse parecer, McGinnis⁹⁶, em

1983, conceituou e classificou cromoblastomicose e feo-hifomicose. Essas considerações foram aparentemente acatadas pela comunidade científica, que passou a adotar as recomendações indicadas para o diagnóstico diferencial das micoses, utilizando a nomenclatura sugerida pelos autores.

2. Epidemiologia

Os fungos causadores da cromoblastomicose são encontrados no solo do mundo todo^{2,96,115,138}, mas regiões tropicais e subtropicais apresentam maior frequência de casos^{2,18,48,96,138,159}. Destacam-se nessas regiões, as áreas rurais, onde as pessoas estão em contato direto e por períodos prolongados com o fungo. Por isso, alguns autores têm considerado essa micose como doença ocupacional⁹⁶. No Nordeste do Brasil, a exposição de trabalhadores rurais ao babaçu (*Orbignya phalerata martins*) foi relacionada ao aparecimento da doença em alguns pacientes, dos quais foi isolado *Fonsecaea pedrosoi*¹⁵⁸. Na Venezuela, pacientes com cromoblastomicose por *Cladophialophora* (*Cladosporium*) *carrionii* relataram que se feriram com cactáceas (*Ritterocereus griseus* e *R. deficiens*), plantas comumente encontradas na região endêmica desse país e da qual o fungo já foi isolado¹⁸².

A doença atinge desde crianças até idosos, mas a faixa de idade com maior número de casos é de 30 a 50 anos^{2,24,96,157,160}. Acredita-se que o paciente é contaminado quando jovem, mas só vai desenvolver a doença em idade mais avançada. Outro fator importante é a contaminação preferencial dos homens em relação às mulheres, a qual independe da ocupação do indivíduo^{2,96}. Alguns autores acreditam que, fatores hormonais possam conferir proteção imunológica contra a infecção. Todas as raças parecem ser suscetíveis à doença¹⁶⁰.

No Brasil, a micose já foi descrita em quase todos os Estados. Embora Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná apresentem maior número de casos publicados^{76,86,87,88,94,123}, os principais focos da micose

encontram-se no Estado do Pará e na microregião da baixada ocidental maranhense^{155,159,160}.

3. Etiologia

São cinco os agentes mais freqüentes: *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Cladophialophora (Cladosporium) carrionii*, *Rhinocladiella aquaspersa* e *Phialophora verrucosa*^{76,96}. Outras espécies, descritas como agentes etiológicos em alguns casos incluem *Wangiella (Exophiala) dermatitides*, *Exophiala spinifera*, *E. jeanselmei* e *E. castelanii*^{5,73,116,125}. Esses agentes são cosmopolitas, mas dependendo do clima ou da região, uns são isolados mais freqüentemente que outros^{2,18,76,96,182}.

Em países de clima úmido, como Brasil, México, Cuba, Porto Rico, Jamaica, República Dominicana e Costa Rica, o fungo principalmente isolado dos casos de cromoblastomicose é *Fonsecaea pedrosoi*^{2,81,123,139,160}. Nas regiões de clima semi-árido da Venezuela, é mais comum o isolamento de *Cladophialophora (Cladosporium) carrionii*¹⁸². Em determinadas regiões da Austrália e da ilha de Madagascar, que apresentam diferentes condições geográficas em seus territórios, pode-se também encontrar mais de um agente; entre estes destaca-se *Fonsecaea pedrosoi* seguido de *Cladophialophora (Cladosporium) carrionii*^{138,182}. Aproximadamente 75% das florestas nativas de Madagascar já foram destruídas desde a chegada dos primeiros habitantes, provocando alterações no clima da região, tornando-o mais árido. Este seria um motivo para o aumento do número de casos por *C. carrionii*⁴⁸. Alguns autores acreditam que a ilha tenha a maior incidência de casos de cromoblastomicose do mundo⁴⁹. Outros países, como China, Japão, Rússia, Índia e África do Sul, também apresentam casos onde o agente mais freqüente é *F. pedrosoi*^{2,18,85}. Cromoblastomicose, causada por *P. verrucosa* foi observada nos Estados Unidos, Japão e China^{2,18,78,85}. Poucos são os relatos da micose causada por *F. compacta*, sendo que Porto Rico, Estados Unidos, Martinica, Cuba, Rússia e Líbia são países onde o

fungo foi isolado^{2,18,138}. O isolamento de *Rhinocladiella aquaspersa* a partir de lesões é descrito como raro; alguns casos relacionados a esse agente foram descritos na Venezuela, Colômbia e no Brasil^{4,76,119}. Espécies de *Exophiala* associadas a doença foram relatadas por autores do México, Estados Unidos, Japão e Brasil^{2,5,116,125}.

4. Aspectos clínicos

A localização das lesões se dá principalmente na região podal, pernas, nádegas e, com menos freqüência, nas mãos e braços. No entanto, já foram observados casos de infecção na região auricular, nasal e em outras partes do corpo^{2,4,9,19}. A doença não compromete o estado geral dos pacientes, mas com o passar dos anos pode incapacitar o indivíduo para o trabalho e convívio social. Alguns autores têm relatado casos em associação com hanseníase, micetoma e câncer^{2,138,156}.

Embora diversos pesquisadores tenham classificado as diferentes formas de lesão como verrucosa nodosa, verrucosa confluyente e verrucosa ulcerosa, observa-se que, de modo geral, o início e a evolução de qualquer delas são os mesmos^{2,76}. Inicialmente, no local da inoculação forma-se uma pequena pápula elevada, eritematóide e não pruriginosa, podendo desaparecer espontaneamente. O desenvolvimento dessa pequena alteração pode ser demorado, formando-se, então, placas verrucosas eritematosas. Com freqüência, formam-se nódulos com centro avermelhado ou acinzentado, duros, com destacada projeção sobre a superfície da pele. A disposição e a configuração dos mesmos conferem ao processo clínico aspecto de “couve-flor”, geralmente pontilhada de elementos negros (*black dots*). Com freqüência, essas lesões estão associadas à infecções bacterianas, secundárias^{2,138}.

Clinicamente, algumas formas de cromoblastomicose podem ser confundidas com várias doenças como blastomicose, sífilis terciária, tuberculose verrucosa da pele, micetoma, leishmaniose, algumas formas de candidíase mucocutânea crônica, esporotricose, lupus eritematoso e

hanseníase^{2,76,138}. Em todos os casos, a simples demonstração do fungo no exame direto do material da lesão e em culturas estabelecem o diagnóstico¹³⁸.

5. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da cromoblastomicose baseia-se na demonstração do fungo em materiais biológicos, obtidos por raspagem e por biópsia da lesão⁹⁶. As características morfológicas de colônias isoladas em meios de cultura sintéticos são importantes para identificação do agente causador.

5.1. Exame direto

Segundo McGinnis⁹⁶, a presença de células muriformes arredondadas, de coloração marrom, com divisão longitudinal (figura 1), no tecido do hospedeiro, diferencia a cromoblastomicose da feo-hifomicose. Embora essas células recebam denominações variáveis de autor para autor, seu encontro confirma o diagnóstico de cromoblastomicose, visto que a morfologia das mesmas independe do fungo causador. Além dessas formas, podem estar presentes hifas demácias e células leveduriformes. A coloração marrom é devida ao pigmento de melanina depositada na parede fúngica³.

Figura 1 – células muriformes em tecido, KOH 10%

5.2. Cultura

Os agentes da cromoblastomicose são de crescimento lento, requerendo até 14 dias para isolamento^{77,102}. As colônias são escuras, aveludadas, com centros elevados. A análise macroscópica não identifica o agente, pois todos apresentam a mesma morfologia colonial^{79,80}.

Microscopicamente, verifica-se que *Fonsecaea pedrosoi* (figura 2) é fungo pleomórfico, isto é, pode apresentar mais de um tipo de conideogênese. O gênero é caracterizado pelo desenvolvimento de conidióforo que origina camada primária de conídios, os quais produzem conídios simpodiais. Estes conídios evoluem para células de conideogênese, as quais originam outras camadas de conídios; os primeiros são largos ($2,5\mu\text{m} \times 12\mu\text{m}$), seguindo-se conídios menores ($1,8\mu\text{m} \times 3,2\mu\text{m}$). Usualmente, este processo resulta em apenas duas ou três camadas de conídios e constitui a morfologia característica do gênero. No entanto, a partir desses conídeos pode haver a formação de três tipos de esporulação: a) tipo cladosporium: conidióforos de comprimentos variados, eretos. Conídios unicelulares ou bicelulares em forma elíptica dispostos em cadeias acrópetas; b) tipo rhinocladiella: conidióforos nodosos com esporulação acropleurógena. Os conídios estão unidos por apículos ao conidióforo; c) tipo phialophora: esporulação semi-endógena em fiáides, com colaretes conspícuos^{37,79,80,97,102,148}.

Figura 2 – *Fonsecaea pedrosoi*

Fonsecaea compacta: também é fungo pleomórfico. Apresenta os três tipos de esporulação de *F. pedrosoi*, sendo que a única diferença entre as duas espécies está na maior quantidade de esporulação em *F. compacta*, o que dificulta a visualização da conidiogênese^{76,97,102}.

Cladophialophora (Cladosporium) carionii: as hifas são septadas, ramificadas e demaciadas. Os conidióforos são eretos, originam os conídios unicelulares e elipsóides. Esses possuem, em média, 2,5µm a 4,5µm e formam cadeias acrópetas¹⁴⁸.

Phialophora verrucosa: as hifas são septadas, ramificadas e demaciadas. Os conidióforos são diferenciados em simples ou ramificados. As fiáides são monofialídicas, obclavadas com constrição na base do colarete em forma de taça. Os conídios não possuem septos, medem de 1 a 2,5µm x 2,4µm a 4,9µm, ficando aglomerados no colarete¹⁴⁸.

Rhinocladiella aquaspersa: as hifas são septadas, ramificadas, demaciadas e os conidióforos são eretos, de parede celular espessa e simpodial. Os conídios são unicelulares alongados (raros bicelulares), acropleurógenos, com diâmetro de 2µm a 5µm aproximadamente¹⁴⁸.

Basicamente, a identificação dos agentes da cromoblastomicose é realizada de acordo com a micromorfologia⁹⁷. Testes de termotolerância podem ser aplicados para diferenciar espécies do gênero *Cladophialophora (Cladosporium)*⁷⁹.

6. Prognóstico e terapia

Os esquemas terapêuticos utilizados no tratamento da cromoblastomicose incluem processos físicos, cirúrgicos e quimioterápicos, mas não existe um consenso universal sobre o procedimento a ser adotado^{24,76,138}. De modo geral, o tipo clínico da lesão, a duração da doença, o sítio de infecção, assim como, as condições físicas e econômicas do paciente direcionam a terapêutica.

Nos primeiros estágios da doença, alguns autores indicam a excisão cirúrgica, eletrodissecação, uso do forno de Bier ou criocirurgia^{76,138}. Em estágios mais avançados, a conduta preferencial tem sido a ministração de medicamentos de modo isolado ou associados^{23,74,82,91,124}.

O iodeto de potássio, por via oral, em concomitância com o iodeto de sódio a 10%, por via venosa, como terapêutica complementar, foi um dos primeiros tratamentos a ser utilizado⁷⁶. Em 1957, Bopp conseguiu bons resultados com associação entre vitamina D2 e iodeto de sódio a 10%¹¹.

Durante a década de 60 e início dos anos 70, vários pesquisadores relataram o uso de tiabendazol com algum sucesso terapêutico e esse tratamento ainda é utilizado em alguns casos^{50,165}. Posteriormente, Lopes et al. relataram que a 5-fluorocitosina, administrada por via oral, sob a forma de comprimidos e por via tópica, sob a forma de pomada, foi eficaz no tratamento da cromoblastomicose⁸⁹. Entretanto, esse mesmo autor observou a ocorrência de resistência com o uso prolongado desta droga⁸⁸. Posteriormente, esses e outros autores preconizaram a associação de anfotericina B com 5-fluorocitosina^{12,13,91}. Apesar de ser considerado por muito tempo tratamento de eleição, sua aplicação depende em grande parte do estado físico do paciente; a nefrotoxicidade e a hepatotoxicidade induzidas pelas drogas podem levar à suspensão do tratamento⁷⁶. A 5-fluorocitosina também já foi utilizada em associação com outros quimioterápicos, como tiabendazol e cetoconazol, com resultados variáveis³⁴.

Em 1978, Yanase¹¹⁷ e colaboradores utilizaram, pela primeira vez, anfotericina B intralesionalmente. Administrações tópicas, em forma de pomadas e administrações endovenosas desse poliênico, também já foram utilizadas, por outros autores, com algum sucesso³¹.

Na década de 80, o cetoconazol foi indicado por diversos pesquisadores que observaram melhora clínica^{58,95,107}. Em 1987, Ganer⁵⁴ realizou o primeiro estudo clínico com um dos azóis de última geração, o itraconazol e observou bons resultados para dois pacientes com cromoblastomicose. A partir daí, vários estudos têm demonstrado a eficácia

do tratamento com esse triazol^{15,75,124,179}, mas ainda há casos de pacientes que não respondem à terapia com o mesmo^{15,23,131}. Por outro lado, foram observados bons resultados com associação de itraconazol e criocirurgia^{10,74}; a cura, ocorrida em alguns casos, foi comprovada por meio de acompanhamento clínico e laboratorial durante meses e em alguns casos durante anos. Outros triazóis, como o fluconazol e o saperconazol também já foram empregados, mas sucesso terapêutico foi observado em poucos casos^{36,52,131,180}.

Na atualidade o uso da terbinafina tem sido destacado na ilha de Madagascar, em pacientes com cromoblastomicose^{49,50}.

Embora diversos tratamentos possam ser utilizados, verifica-se, na literatura consultada, que o número de relatos sobre cura definitiva comprovada é pequeno. Segundo alguns autores, é necessário acompanhamento de cura clínica e micológica durante anos após o término da terapia, visto que, os casos de recidiva são freqüentes^{23,24,96}. Relatos de cura, seguida de acompanhamento durante meses, não são raros, mas a maioria dos pacientes envolvidos sofre recidiva após alguns anos. Muitas vezes a dificuldade na cura deve-se ao próprio paciente que, ao perceber melhora clínica, abandona o tratamento; o retorno desses pacientes ao serviço de saúde usualmente ocorre após o reaparecimento e agravamento das lesões.

II. PROPRIEDADES GERAIS DOS ANTIFÚNGICOS

Em 1951, Hazen e Brown⁶⁵ descobriram o primeiro antibiótico poliênico, a nistatina. Posteriormente, em 1956, Gold e colaboradores¹⁰⁵ relataram as propriedades de outro antibiótico poliênico, a anfotericina B, que apresentava atividade em infecções fúngicas sistêmicas. Durante cerca de uma década, a anfotericina B foi o único antifúngico eleito para o tratamento de micoses profundas¹⁶. A 5-fluorocitosina, desenvolvida em 1957, foi aprovada para comercialização apenas em 1972 nos Estados Unidos¹⁸¹. A associação desta última com a anfotericina B, propiciou bons resultados na terapêutica de diversas micoses, principalmente na candidíase sistêmica⁶⁰. No entanto, quando utilizada de modo isolado, induziu o desenvolvimento de resistência fúngica rapidamente^{7,8,40}.

A elevada toxicidade da anfotericina B, seu uso restrito em hospitais, aumentando muito o custo do tratamento, e a pequena resposta de algumas infecções, levaram à pesquisa de novos fármacos com ação antifúngica¹⁴⁵.

Na década de 1970, os imidazólicos foram introduzidos com boa aceitação, destacando-se o cetoconazol, lançado em 1977 e aprovado para uso nos EUA em 1981¹⁸¹. Esse azol, passível de administração por via oral, foi inicialmente considerado de baixa toxicidade^{7,60}. Entretanto, seu uso amplo e indiscriminado, levou, em pouco tempo, ao aparecimento de algumas cepas resistentes⁷². O mesmo ocorreu com o fluconazol, um triazólico lançado na década de 80 e aprovado para uso nos EUA em 1990¹⁸¹, utilizado em larga escala no tratamento de candidíase oral em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida^{55,167,170,171}. Outro triazólico, o itraconazol, que se tornou disponível logo após o fluconazol, em 1992¹⁸¹, tem mostrado bons resultados no tratamento de diversas micoses profundas, sendo indicado, em alguns casos, como droga de primeira escolha, atualmente, também o é para cromoblastomicose^{41,61,82,124,135}.

Na última década, antimicóticos da classe das alilaminas, como a terbinafina, têm mostrado alta eficácia contra infecções fúngicas da pele, unha e cabelo, quando ministrada por via oral ou tópica⁶³. Em casos de cromoblastomicose foi relatado sucesso terapêutico com terbinafina em pacientes de Madagascar^{50,49}.

fungistáticas, sua ligação ao ergosterol resulta na despolarização e aumento da permeabilidade da membrana para prótons e cátions monovalentes, essenciais para a célula fúngica¹⁶. Em concentrações fungicidas, essa ligação promove a formação de poros e, em consequência, o efluxo de moléculas maiores, o que leva à falência celular¹⁶.

Os efeitos da anfotericina B sobre a célula são complexos e dependem de uma variedade de fatores. Pesquisas realizadas em cultura de células L indicaram que esses efeitos podem ser divididos em estágios dependentes da dose: estimulação, permeabilização e letalidade¹⁶. Em baixas concentrações, observou-se estimulação; em doses maiores, verificou-se aumento de permeabilidade e em altas doses a anfotericina B foi fungicida¹⁶. Esses dados indicam que a letalidade não decorre apenas da alteração de permeabilidade da membrana celular. Vários relatos indicam que eventos dependentes de oxidação também estão envolvidos na atividade celular desse poliênico^{16,164}. Em adição, esses eventos podem induzir a estimulação do sistema imune do hospedeiro, aumentando a opsonização da imunoglobulina G¹⁶. Alguns estudos demonstram que o dano celular pode também ser provocado por radicais scavengers extracelulares, hipóxia ou pró-oxidantes¹⁶.

Espectro de ação

A anfotericina B possui amplo espectro de ação. Tem atividade contra fungos dimórficos (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitides*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*), leveduras (*Cryptococcus neoformans* e *Candida* spp), bolores (*Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Trichophyton* spp, *Microsporum* spp e *Epidermophyton* spp) e agentes da cromoblastomicose^{16,38}. Pode também apresentar atividade em algumas formas de zigomicose, hialo-hifomicose e feo-hifomicose, mas é pouco efetiva na tricosporonose e infecções causadas por *Pseudallescheria boydii*¹⁶.

Toxicidade

Preparações tópicas e orais de anfotericina B não são consideradas tóxicas para o hospedeiro, mas a solução parenteral pode apresentar efeitos colaterais tanto em períodos curtos quanto em períodos prolongados de tratamento³⁸. O comprometimento das funções renais é quase sempre uma consequência inevitável do uso da droga. Estudos realizados em humanos e animais, demonstraram ausência de mutagênese, carcinogênese ou teratogênese induzida pela droga^{18,38}.

Farmacocinética

As propriedades farmacocinéticas da anfotericina B têm sido pouco estudadas. Sabe-se que não é absorvida pela pele ou pela mucosa quando aplicada topicamente e que ocorre pouca ou nenhuma absorção no trato gastrointestinal ulcerado ou normal^{18,38}.

Para aplicação endovenosa, recomenda-se que a anfotericina B seja inicialmente ministrada em pequenas doses gradualmente aumentadas para reduzir os efeitos tóxicos. Este procedimento permite obter níveis séricos terapêuticos entre 0,2µg/ml e 0,5µg/ml, após dose de 25mg, que são mantidos por 10 horas. Depois, são ministradas doses de 50 mg que podem alcançar níveis séricos de 1,0µg/ml a 2,0µg/ml, em uma hora^{7,18,38,135}. A administração de dose de 3mg/kg de anfotericina B lipossomal, com intervalos de 24 horas pode atingir concentrações plasmáticas de até 20µg/ml⁸⁴. Após infusão venosa, somente 10% da droga permanece no sangue, sendo que, deste total, 90 a 97% se ligam às proteínas plasmáticas, especialmente às lipoproteínas. O restante da droga se liga rapidamente às membranas do hospedeiro³⁸. Em preparações convencionais a meia vida plasmática é de 24 a 48 horas, seguindo-se uma segunda fase de eliminação após 15 dias da ministração³⁸. Na preparação lipossomal o tempo de meia vida é de 0,4 a 0,8 horas e a segunda eliminação é de 26 a 38 horas¹³⁵. As vias de eliminação da anfotericina B no homem são pouco conhecidas; estima-se que aproximadamente 3% da dose diária seja excretada na urina depois de terapia longa^{18,38}.

Concentrações no líquido cefalorraquiano usualmente correspondem a, apenas, de 2 a 4% da concentração no soro. Por isso, pacientes com meningite fúngica recebem, de preferência, tratamento intratecal^{18,38}.

Uso terapêutico

É indicada no tratamento de candidíase orofaríngea, esofágica e do trato gastrointestinal, além de estomatite causada por prótese³⁸. Também é utilizada como profilática em circunstâncias que predisõem a disseminação da candidíase para o trato gastrointestinal e outros órgãos, e no tratamento da candidíase vaginal, cutânea e mucocutânea, assim como de micoses sistêmicas³⁸.

A dose usual de anfotericina B é de 0,5mg a 0,6mg/kg, administrados, juntamente com solução de glicose a 5%, por mais de 4 horas³⁸. No tratamento da esofagite por *Candida* spp em adultos a dose diária recomendada é de 0,15mg a 0,2mg/kg, a qual pode ser ministrada oralmente na forma de suspensão ou pastilhas³⁸. Estas últimas também são recomendadas no tratamento de candidíase, causada pelo uso de prótese dentária, devendo ser utilizadas seis vezes ao dia por períodos prolongados³⁸. Na profilaxia da candidíase vaginal, indica-se o uso de tabletes em associação com antibacterianos de amplo espectro. Cremes ou pomadas podem ser aplicados, quatro vezes ao dia, em infecções da pele e unha, durante 2-4 semanas, ou, se necessário, por período mais prolongado³⁸.

Vários esquemas terapêuticos foram propostos para o tratamento de micoses sistêmicas com anfotericina B^{18,38,60}. No entanto, como o diagnóstico dificilmente é realizado no início da doença, o tratamento acaba sendo mais agressivo que o usual³⁸. Em infecções por zigomicetos, na aspergilose invasiva, criptococose, hialo-hifomicose, feo-hifomicose, tricosporonose e penicilose por *Penicillium marnefei*, é indicada a administração endovenosa de 1,0 a 1,2mg/kg/dia até a estabilização do quadro clínico³⁸. A anfotericina B também pode ser utilizada em blastomicose, paracoccidioidomicose, histoplasmose e coccidioidomicose,

quando essas não respondem à terapia com azóis, evoluem rapidamente, ocorrem em indivíduos imunossuprimidos ou atingem o sistema nervoso central³⁸. Em meningites severas, a injeção intratecal é indicada, geralmente com doses iniciais de 0,05 a 0,1mg, aumentando para 0,5mg, três vezes por semana^{38,60}. A dosagem máxima é dependente das condições renais e do nível de creatinina plasmática; aumento do nível de creatinina requer diminuição da dosagem^{18,38}. O uso de formulações lipídicas, principalmente as lipossomais, em micoses sistêmicas tem a finalidade de reduzir a toxicidade da anfotericina B sem que haja redução do nível de droga no sítio de atuação^{38,69}; vários estudos comprovaram a melhor eficácia desta formulação, com nítida redução dos efeitos colaterais, quando comparada a anfotericina B tradicional^{69,84}. Entretanto, alguns autores relatam aparecimento de outros efeitos que não foram observados anteriormente: choque anafilático, taquicardia e reação alérgica severa^{27,84,106}.

Reações adversas

Entre os efeitos indesejáveis causados pela administração intravenosa da anfotericina B incluem-se: febre seguida de calafrios, náusea, vômitos, dispnéia, hipotensão; em infusões locais pode causar tromboflebite^{38,60}. Entre as alterações hematológicas e bioquímicas destacam-se ocorrência de anemia, hipocalcemia e hipomagnesia. A extensa disfunção renal é observada na dosagem cumulativa; quando a dose total excede a 4mg, pode resultar dano renal permanente^{7,38}.

Interações medicamentosas

Anfotericina B utilizada em associação com corticóides pode aumentar a perda de potássio³⁸. Entretanto, a hipocalcemia provocada apenas pela anfotericina B pode potencializar os efeitos tóxicos dos digitálicos glicosilados. Em alguns fungos, determinados azóis, como o miconazol e o cetoconazol, podem ter sua atividade antifúngica antagonizada pela anfotericina B^{38,60}. A associação sinérgica entre anfotericina B e 5-fluorocitosina contra algumas cepas de *Candida* spp,

Cryptococcus neoformans e na cromoblastomicose foi comprovada por vários autores^{7,38,91}. Drogas como ciclosporina e aminoglicosídeos podem potencializar os efeitos nefrotóxicos³⁸.

Resistência

Após mais de 40 anos de uso da anfotericina B, relatos de resistência são raros. No entanto, alguns autores consideram que dificuldades para detectar resistência podem estar mascarando a verdadeira incidência destes casos¹⁸. A carência de teste padrão de suscetibilidade, para uso em rotina laboratorial, assim como a falta de correlação ótima entre os resultados dos testes atualmente padronizados e a resposta clínica à terapêutica, são alguns dos fatores que têm limitado os conhecimentos sobre a ocorrência da mesma¹⁸.

Poucos são os casos de resistência adquirida a anfotericina B. Entre estes, comprovou-se que cepas de *Candida* spp, isoladas de pacientes imunocomprometidos, não respondia ao poliênico *in vitro* e alguns pacientes evoluíram para óbito⁴³. O principal mecanismo de resistência proposto para esses casos foi alteração nos lipídeos da membrana celular fúngica, especialmente o ergosterol, principal sítio de ligação da droga. Essa alteração seria promovida pelos genes, “*ergosterol biosynthetic enzymes*” (ERG2 e ERG3) que expressam enzimas que atuam na biossíntese do ergosterol¹⁷⁶. Este mecanismo também tem sido considerado para resistência intrínseca, mas com interferência, ainda desconhecida, de genes⁴³. Neste sentido, procura-se explicar a ausência de resposta de alguns fungos à anfotericina B, atribuindo-se esse comportamento à baixa concentração ou ausência de ergosterol na membrana celular^{18,32,161}. Alguns demácios como, *F. pedrosoi* e *Madurela grisea*, podem estar assim envolvidos, mas outros fungos, que também apresentam resistência intrínseca à anfotericina B, como, *C. lusitaniae*, *Trichosporon beigelli*, *Pseudallescheria boydii*, *Fusarium* spp, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* e *Scedosporium prolificans*, possuem concentrações de ergosterol consideradas normais^{18,43,172}.

Outro mecanismo de resistência, que inclui o aumento da atividade de catalase inibindo o dano oxidativo promovido pela anfotericina B na membrana celular, tem sido considerado. No entanto, assim como o mecanismo de oxidação, ainda necessita de estudos mais amplos para ser completamente elucidado¹⁸.

1.2. 5-Fluorocitosina

A 5-fluorocitosina é antifúngico sintético, quimicamente definido como pirimidina fluorada, relacionado ao fluorouracil e à floxuridina. É solúvel em água, pouco solúvel em álcool e praticamente insolúvel em clorofórmio e éter. A solução para infusão venosa deve ser acondicionada entre 18°C e 25°C, podendo precipitar em baixas temperaturas; em altas temperaturas pode ocorrer a decomposição para fluorouracil^{7,134,40}.

Formulação

Em diversos países a droga encontra-se disponível em formulações para uso oral e parenteral, mas no Brasil, não está sendo comercializada no momento. Tabletes contendo 500mg de 5-fluorocitosina são fabricados na Europa e cápsulas com 250mg e 500mg são comercializadas nos Estados Unidos. Para infusão venosa, embalagens contendo 10mg/ml da droga em solução salina, podem ser encontradas em várias partes do mundo⁴⁰.

Mecanismo de ação

Nas células sensíveis, a 5-fluorocitosina é convertida a 5-fluorouracil, pela enzima citosina desaminase. O produto formado é um potente antimetabólito, que sob a ação da enzima uridina monofosfato pirofosforilase, é convertido a ácido 5-fluorouridílico. A partir desta substância ocorre a síntese de 5-fluorouridina trifosfato, que se liga ao RNA

levando à síntese de proteínas anômalas. O ácido 5-fluorouridílico pode também ser metabolizado a ácido 5-fluorodeoxiuridílico, que é potente inibidor da timidilato sintetase. Como consequência, a síntese de DNA fica prejudicada. As células dos mamíferos não convertem a 5- fluorocitosina em fluorouracil, não interferindo, assim, na especificidade da droga para células fúngicas^{7,60,40}.

Espectro de ação

A 5-fluorocitosina possui atividade antifúngica contra *C. neoformans*, *Candida spp*, *Candida glabrata* e agentes da cromoblastomicose. Para essas espécies a determinação da suscetibilidade *in vitro* a 5-fluorocitosina é dependente do método empregado e a correlação com a clínica, é pequena^{7,40}.

Toxicidade

A droga não é mutagênica e embora embriotoxicidade e propriedades teratogênicas tenham sido observadas em ratos, não o foram em camundongos. É utilizada, com restrições em mulheres grávidas, mesmo que não existam relatos de anormalidades fetais. Distúrbios gastrointestinais, hepáticos e na função da medula óssea, foram relatados^{7,40}.

Farmacocinética

A 5-fluorocitosina é rápida e completamente absorvida após administração oral, em pacientes com funções fisiológicas normais. É amplamente distribuída no organismo, aproximando-se da distribuição do volume de água total. Os níveis séricos após duas horas de administração de uma dose oral de 2g, alcançam picos de $30 \pm 2,8 \mu\text{g/ml}$, mas em pacientes com criptococose pode atingir de $48,5 \pm 2,5 \mu\text{g/ml}$ após uma a duas horas da administração^{7,60,135}. Em pacientes com função renal comprometida, o nível máximo pode levar até dez horas para ser atingido. Apenas cerca de 4% da dose absorvida ligam-se as proteínas plasmáticas; cerca de 80% da

dose é excretada na urina, sem modificações, em concentrações variáveis de 200 a 500µg/ml⁴⁰. Em geral, a meia vida plasmática é de 3 a 6 horas, mas em pacientes com comprometimento renal, pode chegar a 200 horas⁴⁰. A concentração no líquido cefalorraquidiano é equivalente a 65% a 85% da encontrada no plasma^{7,40}.

Menos que 1% da dose de 5-fluorocitosina é desaminada a 5-fluorouracil ou a dehidrofluorouracil. O composto remanescente é excretado inalterado na urina⁴⁰.

Uso terapêutico

A 5-fluorocitosina tem sido indicada para o tratamento de candidíases sistêmicas e de criptococose, em doses que variam de 100 a 200mg/Kg, ministradas fracionadas em 24 horas. Quando há disfunção renal, a dose deve ser ajustada. O uso associado com anfotericina B é indicado para evitar resistência^{7,40}. Na cromoblastomicose a 5-fluorocitosina não deve ser administrada isoladamente, pois o aparecimento de cepas resistentes é muito rápido; neste caso, a associação com anfotericina B ou outros fármacos é o mais recomendado^{7,40,88}.

Reações adversas

Alterações gastrointestinais (náuseas, vômitos e diarreias), do sistema nervoso central (sonolência, vertigens) e manifestações na pele (eritema e prurido), já foram descritos. Funções anormais hepáticas e da medula óssea são os achados laboratoriais mais freqüentes. A toxicidade é observada com maior freqüência em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida ou com azotemia, ou quando as concentrações do fármaco ultrapassam 100µg/ml^{7,40,60}.

Interações medicamentosas

O uso da 5-fluorocitosina associada a anfotericina B pode resultar em sinergismo. Anfotericina B atua na membrana fúngica facilitando a ação da 5-fluorocitosina no RNA e DNA do fungo^{40,60}. Esta associação tem a grande

vantagem de evitar o surgimento de cepas resistentes, além de diminuir a dosagem das drogas, minimizando os efeitos colaterais. Entretanto, quando existe disfunção renal, pode aumentar a toxicidade das drogas^{7,40}. O hidrocloreto de citarabina pode antagonizar os efeitos do antifúngico⁴⁰.

Resistência

Não é raro o surgimento de resistência secundária quando a droga é utilizada isoladamente no tratamento de candidíase e criptococose⁴⁰. Alterações nas concentrações inibitórias mínimas variaram de 2,5µg/ml a 360µg/ml frente a diferentes cepas de leveduras⁷. O mecanismo de resistência à 5- fluorocitosina pode estar associado a várias enzimas. A deficiência ou ausência e/ou excesso de componentes da síntese protéica que podem competir com os antimetabólitos fluorados, podem ser fatores associados à resistência^{43,121}.

Entre as espécies de *Candida*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são menos sensíveis à 5-fluorocitosina e cerca de 21% das espécies de *Candida* isoladas nos Estados Unidos são resistentes antes do tratamento, o que caracteriza resistência intrínseca¹⁷⁰. Em casos de cromoblastomicose, diversos autores comprovaram a ocorrência de resistência adquirida^{88,121}.

1.3. Terbinafina

O hidrocloreto de terbinafina também é produto de síntese, mas diferente do anterior, apresenta função alilamina terciária com um átomo de nitrogênio que tem dupla ligação vizinha⁸¹.

Formulação

A droga é comercializada para uso tópico em forma de creme contendo 1% do princípio ativo e para administração oral, em comprimidos de 125mg ou 250mg^{61,134}.

Mecanismo de ação

As alilaminas são potentes inibidores da biossíntese do ergosterol. Ligam-se a enzima esqualeno epoxidase, causando, desta maneira, acúmulo de esqualeno, assim como, deficiência de ergosterol¹⁴². O efeito fungicida pode ser observado em alguns fungos, mesmo em concentrações que não inibam por completo a biossíntese do ergosterol. É possível que esse efeito ocorra em função do acúmulo de esqualeno intracelular. Tal mecanismo ainda é pouco conhecido, mas acredita-se que, elevadas concentrações dessa substância intermediária possam interferir na função da membrana e na síntese da parede celular fúngica¹⁴³.

Espectro de ação

Ensaio *in vitro* demonstraram amplo espectro de ação da terbinafina. Observa-se atividade fungicida contra dermatófitos, *Sporothrix shenckii* e outros fungos dimórficos, *Aspergillus* spp, *Scopulariopsis brevicaulis*, espécies de *Acremonium*, *Hendersonula* e fungos demácios^{61,99}. A ação sobre *Candida* é variável e dependente da espécie. A droga é fungicida para *C. parapsilosis*, mas tem atividade fungistática para *C. albicans*⁶¹.

Farmacocinética

Após administração oral, cerca de 70 a 80% da droga são absorvidos. A concentração plasmática máxima é atingida após duas horas da ingestão. Doses usuais de 250mg e 500mg resultam em concentrações aproximadas de 0,9µg/ml e 1,7µg/ml a 2,0µg/ml, respectivamente^{7,61,135}. Níveis estáveis são atingidos entre 10 e 14 dias de tratamento. Liga-se amplamente as proteínas do soro, principalmente à albumina e a frações do colesterol, HDL

e LDL, o que pode explicar a ausência de atividade em micoses sistêmicas¹⁴¹. A droga é bem distribuída no organismo, mas possui elevada afinidade por tecidos adiposos, como a pele, o que leva ao baixo nível plasmático^{62,141}. Altas concentrações são encontradas no extrato córneo, couro cabeludo e cabelo^{61,63}. A terbifina é metabolizada no fígado e já foram identificados 15 metabólitos⁶³. Estes possuem atividade antifúngica baixa e são menos lipofílicos. A eliminação do fármaco é trifásica. Cerca de 80% da dose oral administrada é excretada na forma de metabólitos na urina e o restante nas fezes^{61,141}.

Uso terapêutico

A terbinafina é indicada no tratamento de infecções causadas por dermatófitos, como *tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea pedis*, *tinea manum* e *tinea unguium*^{61,63}. A administração diária de 250mg por via oral é a terapêutica utilizada principalmente em casos de comprometimento da unha, e tem duração de 6 semanas a 3 meses. O uso do creme a 1% é mais indicado no tratamento de infecções da pele por dermatófitos por período de 1 a 2 semanas, com aplicação 2 vezes ao dia. Também é indicado no tratamento da pitíriase versicolor por 2 semanas^{61,63}.

Reações adversas

Na maioria das vezes, os efeitos colaterais são notados na primeira semana de tratamento. Distúrbios gastrointestinais são os mais apontados, incluindo, dispnéia, gastrite, vômitos, náuseas e diarreias^{61,63,134}. Distúrbios relacionados ao paladar são frequentes e incluem desde alterações até perda parcial ou total do paladar, além de gosto metálico⁶³. Raramente pode causar disfunção hepatobiliar, como hepatites. Também foram observadas reações na pele, como urticária, eczema, eritema e prurido^{61,63}.

Interação medicamentosa

A terbinafina não apresenta interferência significativa no metabolismo de outras drogas. No entanto, fármacos como cimetidina e rifampicina, que

atuam no metabolismo mediado pelo citocromo P-450, podem afetar o catabolismo da terbinafina, acelerando o ritmo de eliminação do composto. Nestes casos a dose deve ser ajustada para que a droga possa ter o efeito esperado⁶¹.

Resistência

Relatos de patógenos humanos resistentes à terbinafina ainda não foram encontrados, mas já foram descritos fenótipos resistentes de *Saccharomyces cerevisiae* e *Ustilago maydes*. Além disso, em uma cepa de *Candida glabrata* resistente ao fluconazol, observou-se resistência cruzada com terbinafina^{170,171}.

1.4 Cetoconazol

A estrutura dos compostos azólicos é basicamente formada por um anel nitrogenado, de cinco membros, unido a outro anel aromático por meio de ligação carbono-nitrogênio¹⁴⁵. Os compostos imidazólicos contêm dois átomos de nitrogênio no anel azólico¹⁴⁵. O cetoconazol é um composto sintético dioxolano- imidazol¹⁰¹. É um pó branco, praticamente insolúvel em água, parcialmente solúvel em álcool, solúvel em metil-álcool e em solução aquosa acidificada, esta propriedade é conferida, em parte, pelo anel piperazínico, que é básico^{8,101}. Deve ser protegido da luz direta^{8,134}.

Formulação

O cetoconazol está disponível para uso oral na forma de tabletes contendo 200 mg de droga e também em forma de suspensão com 200mg/ml do princípio ativo. Para uso tópico é encontrado nas formas de creme e shampoo com 2% da droga⁴².

Mecanismo de ação

O mecanismo de ação primário do cetoconazol é a inibição da biossíntese do ergosterol, como resultado de sua ligação ao citocromo P-450¹⁴⁵. Sabe-se que, para ocorrer a demetilação do lanosterol-14-alfa-metil-esterol, um intermediário da biossíntese do ergosterol, é necessária a ativação do citocromo P-450. O cetoconazol interfere nesta ativação ligando-se ao cofator heme do citocromo P-450 por meio do N₃, impedindo, portanto, a ação da enzima^{101,145}. Além disto, o acúmulo de 14 alfa-metil-esterol pode desagregar o arranjo das cadeias acídicas dos fosfolípidios e prejudicar as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados a membrana¹⁴⁵. Assim, alterações na atividade de ATPase e de enzimas do sistema de transporte de elétrons, produz a inibição do crescimento dos fungos¹⁰¹. Em altas concentrações, o cetoconazol pode inibir enzimas peroxidativas e oxidativas do citocromo C, causando aumento na geração de peróxido intracelular^{60,145}. Em baixas concentrações demonstrou habilidade para impedir a transformação de células leveduriformes em pseudo-hifas, as quais são tóxicas para leucócitos e macrófagos^{60,145}. Sua ação primária é fungistática. Em doses acima de 800mg pode ter atividade fungicida, mas nesta concentração os efeitos colaterais são frequentes, não compensando o risco⁸.

Espectro de ação

Cetoconazol possui amplo espectro de ação, é ativo contra *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, várias espécies de *Candida* e dermatófitos, e também atua na pitíriase versicolor^{7,60}. Apresenta efeito moderado na

criptococose. Os agentes, causadores de esporotricose e cromoblastomicose, assim como, da aspergilose não respondem ao antifúngico^{7,60,145}.

Toxicidade

Estudos com animais em tratamento prolongado com cetoconazol, detectaram aumento dos níveis de enzimas hepáticas no soro, anorexia reversível, emese e em altas doses, icterícia e morte em 4 semanas⁴². A fertilidade foi reduzida tanto em animais machos como em fêmeas. Teratogenicidade e mutagenicidade também foram observadas em pesquisas com animais, mas não foram detectados efeitos carcinogênicos. Relatos de hepatotoxicidade em humanos são frequentes⁴².

Farmacocinética

Cetoconazol não é absorvido a partir de aplicação tópica, mas é bem absorvido quando ministrado por via oral. Após administrações orais de 200mg, 400mg e 800mg, os picos máximos de concentração plasmática são cerca de 8µg e 20µg, que podem ser atingidos de 2 a 4 horas respectivamente^{7,135}. A absorção oral do cetoconazol varia entre indivíduos. Como a droga necessita de meio ácido para ser melhor absorvida, os pacientes que fazem uso de agentes bloqueadores do receptor histaminérgico H₂, como cimetidina, ranitidina ou a famotina podem comprometer a biodisponibilidade da droga e consequentemente a atividade do cetoconazol¹³⁵. Ainda existem controvérsias quanto a ingestão do medicamento após a alimentação^{7,42,135}. Segundo alguns autores este procedimento reduz um pouco a absorção, mas quase não interfere no pico plasmático¹³⁵. A concentração vaginal aproxima-se muito da plasmática, mas, menos que 1% da concentração total da droga é detectada no líquido cefalorraquiano de pacientes com meningite fúngica¹³⁵. O tempo de meia vida é dose dependente, podendo chegar de 7 a 8 horas com doses de 800mg¹³⁵. A eliminação é bifásica. A droga é metabolizada pelo fígado, onde o primeiro passo é a quebra dos anéis piperazínicos e imidazólicos através

de reações de oxidação⁴². Os metabólitos não têm propriedades antifúngicas e são excretados pela bile no trato gastrointestinal. Cerca de 70% da droga ingerida é excretada nas fezes e urina⁴².

Uso terapêutico

O uso de 200mg diariamente é indicado na paracoccidioidomicose, blastomicose e coccidioidomicose, por um período de 6 meses⁴². Doses diárias de 200mg a 400mg podem ser utilizadas em infecções sistêmicas por *Candida* spp, quando não respondem ao tratamento com anfotericina B ou com 5-fluorocitosina^{7,142}. Na candidíase mucocutânea crônica e na dermatofitose, doses de 200mg a 400mg, também são recomendadas diariamente⁴². A profilaxia em pacientes com o sistema imunológico debilitado é realizada com 400mg/dia em adultos e 200mg/dia em crianças^{7,145}. Na candidíase cutânea, na dermatofitose e na pitíriase versicolor, o uso do creme também é indicado⁶⁰.

Reações adversas

Náuseas, vômitos e anorexia são os efeitos adversos mais observados, mas são dependentes da dose e podem ser reduzidos quando a droga é utilizada com a alimentação noturna, ou quando é fracionada⁶⁰. Erupções cutâneas alérgicas, pruridos e queda de cabelo, também já foram descritos. Da mesma forma que o cetoconazol inibe a síntese de esteróis nos fungos, também o faz nos pacientes, através da ação inibitória sobre os sistemas enzimáticos dependentes do citocromo P-450, evidenciando anormalidades endocrinológicas^{42,60}. Distúrbios menstruais nas mulheres, ginecomastia, perda do libido e da potência nos homens, são os efeitos mais comuns^{42,60}. Pequenas alterações transitórias nos testes de funções hepáticas podem ser observadas e, nestes casos, o tratamento deve ser descontinuado se persistirem e/ou evoluírem para sintomas de disfunção hepática. Raramente é observado idiosincrasia, sendo que na maioria dos pacientes o dano celular pode ser reversível^{42,60}.

Interações medicamentosas

Drogas que reduzem a acidez gástrica, como antiácidos, anticolinérgicos e antagonistas H₂, levam a redução da absorção do cetoconazol⁴². Rifampicina, isoniazida e fenitoína reduzem os níveis séricos do cetoconazol. O uso concomitante deste azol com varfarina, astemizol, terfenadina e ciclosporina aumenta os níveis séricos das drogas, exacerbando, assim, a atividade farmacológica das mesmas^{42,60}. A anfotericina B pode ser antagonizada pelo cetoconazol^{42,60}. Os efeitos dos corticosteróides também são potencializados. Vermelhidão facial e náuseas, são efeitos observados após ingestão de cetoconazol em concomitância com álcool^{42,60}.

Resistência

A introdução do cetoconazol na terapia de pacientes com candidíase mucocutânea crônica teve efeito benéfico em proporções substanciais. Entretanto, relatos de falha terapêutica e desenvolvimento de cepas resistentes foram observadas com frequência nesse grupo de pacientes^{72,114,172}. Relatos de insucessos terapêuticos na candidíase vulvovaginal recorrente foram relacionados com resistência¹⁷². No entanto, testes *in vitro* não detectaram aumento de concentração inibitória mínima em isolados posteriores na maioria dos casos⁹². Por isso, alguns autores acreditam que a recorrência não está correlacionada com resistência microbiológica e sim com fatores do hospedeiro, excetuando-se alguns casos⁹². O mecanismo de resistência do cetoconazol parece ser dependente da cepa: em alguns relatos, a mudança na composição da membrana diminuiu a sensibilidade ao azol e em outros esta redução se deve às mudanças na atividade enzimática¹⁷². Resistência cruzada com fluconazol e itraconazol, já foram observadas^{43,171}.

1.5. Fluconazol

Os triazóis possuem três átomos de nitrogênio no anel azóico. Entre os últimos compostos, encontra-se o fluconazol, que é um bistriazol fluorado, obtido por síntese. Não é solúvel em álcool, mas apresenta solubilidade em água^{7,61,134,145,39}.

Formulação

A droga é comercializada na forma de cápsulas para uso oral, contendo 50, 150 ou 200mg. Para infusão venosa, encontra-se disponível solução com 2µg/ml de fluconazol em 0,9% de cloridrato de sódio. Nos Estados Unidos, a droga também é comercializada sob a forma de tabletes com concentrações de 50, 100 ou 200mg^{61,39}.

Mecanismo de ação

O mecanismo de ação do fluconazol é semelhante ao do cetoconazol, sua ação primária é a inibição da síntese do ergosterol, através da enzima alvo 14 alfa demetilase do citocromo P-450¹⁴⁵. No entanto, o aumento de um átomo de nitrogênio no anel azóico, confere maior seletividade com o sítio de ação, causando menor efeito nas outras reações mediadas pelo citocromo P-450^{8,145}. Compostos heterocíclicos como o fluconazol formam um complexo com metade do ferro do heme do citocromo P-450, isto evita a fixação e ativação do oxigênio¹⁰¹. Nos imidazóis essa interferência é feita pelo N₃ e nos triazóis pelo N₄¹⁴⁵. Além de aumentar a seletividade, o aumento de um átomo de nitrogênio também confere grande estabilidade metabólica ao triazóis aumentando assim o tempo de meia vida

plasmática⁸. Em altas concentrações, o fluconazol também pode inibir enzimas peroxidativas e oxidativas do citocromo c, causando aumento na geração de peróxido intracelular^{61,145}.

Espectro de ação

Fluconazol, pode exercer atividade antifúngica em vários patógenos clínicos, tais como, *C. neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e na maioria das espécies de *Candida*. Entretanto, *Candida krusei* e algumas espécies de *Aspergillus*, parecem possuir resistência intrínseca^{43, 39,61,170}.

Toxicidade

Estudos em animais, mostraram a ocorrência de pequenos efeitos hepatotóxicos. No entanto, em altas doses, o fluconazol pode induzir anormalidades fetais. Alguns autores têm relatado teratogenicidade em fetos de pacientes tratadas com esse azol durante a gestação^{39,122}.

Farmacocinética

A absorção da droga é rápida e ampla, ocorrendo quase que exclusivamente pelo trato gastrointestinal. A biodisponibilidade do fluconazol não é afetada pela ingestão de alimentos ou pela acidez gástrica. O pico de concentração plasmática é de 1,9µg/ml, após 1 a 2 horas da administração de 100mg; após doses repetidas os picos podem atingir de 4µg/ml a 8µg/ml. Doses diárias de 200mg e 400mg alcançam níveis plasmáticos de 10,1µg/ml e 18,9µg/ml, respectivamente^{7,39,135}. A meia vida plasmática é de 30 horas. Níveis estáveis de concentração plasmática são obtidos com 7 dias de tratamento, com picos de 6,3mg, após administração diária de 100mg. A ligação a proteínas plasmáticas é baixa, cerca de 11%. A droga tem boa penetração em todos os tecidos e fluidos do corpo, incluindo o sistema nervoso central, onde alcança de 50 a 90% da concentração plasmática. Aproximadamente 80% da droga é excretada na urina em sua forma original, o restante é eliminado em forma de metabólitos^{39,145}.

Uso terapêutico

Fluconazol é indicado em candidíases orais, vaginais, esofágicas e na manutenção da terapia na meningite causada por *C. neoformans*; também pode ser utilizado na candidíase disseminada, na profilaxia de infecções fúngicas em pacientes neutropênicos com câncer, em alguns casos agudos de histoplasmoses ou de coccidioidomicose, infecções da pele por dermatófitos e leveduras e em infecções fúngicas do trato urinário^{39,145}. Em candidíase oral, a dose diária recomendada é de 50 a 100mg e a resposta aparece depois de alguns dias. Em pacientes com o sistema imune debilitado, a dose de 100mg durante 2-4 semanas é a mais indicada. Os casos de candidíase vaginal em pacientes normais são tratados com dose única de 150mg. Em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida, que apresentam candidíase esofágica, a dose recomendada no tratamento agudo é de 100 a 200mg por dia durante 2 semanas; em casos de criptococose, recomenda-se manutenção da terapia, com 200mg diárias^{39,61,145}.

Reações adversas

Os efeitos colaterais observados foram: náuseas, vômitos, cefaléia, erupções cutâneas, dor abdominal, diarreias e raramente alopecia. Raros casos de óbito por insuficiência hepática e pela síndrome de Stevens-Johnson, foram observados. Embora a relação entre o uso do fluconazol e os óbitos não esteja clara, recomenda-se suspender o tratamento, quando sintomas desses distúrbios aparecerem^{39,61,145}.

Interações medicamentosas

O fluconazol aumenta os níveis plasmáticos de fenitoína, rifabutina, ciclosporina, sulfoniluréias, tolbotamina e varfarina. Provoca poucas modificações no metabolismo da teofilina e dos anticoncepcionais orais^{39,61,145}.

Resistência

O amplo uso de fluconazol como agente profilático e terapêutico, especialmente em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida, resultou no aumento de cepas resistentes, principalmente de *Candida albicans* e *C. glabrata*^{43,170,171}. Relatos de resistência em outras leveduras também foram descritos, como em *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*^{117,169}. Na maioria dos casos a resistência é secundária, adquirida durante o tratamento. No entanto, *C. krusei* parece ter resistência inata ao fluconazol, mas também há relatos de resistência intrínseca em *C. albicans*, mesmo em pacientes que não apresentavam comprometimento do sistema imunológico⁶⁸.

Alguns mecanismos de resistência têm sido pesquisados, como alterações nas enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol e mudança no acúmulo de azol intracelular. Estudos moleculares têm demonstrado super-expressão de diferentes genes codificadores de proteínas transportadoras de drogas específicas ou de múltiplas drogas, e também formação de mutantes com alterações no citocromo P-450^{43,170,171}.

1.5. Itraconazol

Sintetizado em 1980, o itraconazol é um triazol queratinofílico, lipofílico, insolúvel em água, pouco solúvel em álcool e solúvel em dimetilssulfóxido; pode-se obter concentrações acima de 10% em alguns solventes orgânicos e em polietilenoglicol acidificado. O anel triazólico, presente no itraconazol e no fluconazol, pode conferir a essas drogas aumento da potência, redução de toxicidade e amplo espectro de ação, quando comparadas aos derivados imidazólicos^{41,134,145}.

Formulação

O itraconazol encontra-se disponível apenas para uso oral, na forma de cápsulas gelatinosas contendo 100mg da droga⁴¹.

Mecanismo de ação

O itraconazol possui mecanismo de ação semelhante a dos outros azóis, como o fluconazol, mas seu espectro de ação é um pouco mais amplo sendo ativo também contra fungos filamentosos, que possuem enzima diferente da 14 alfa demetilase, a 24-metileno-dihidro-lanosterol^{98,171}. Sua ação primária, também é fungistática^{134,145}.

Espectro de ação

A droga possui amplo espectro de ação, incluindo uma grande variedade de patógenos fúngicos. Sua atividade foi demonstrada clínica e microbiologicamente em diversos modelos de infecções sistêmicas por *Aspergillus spp*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix shenckii*. Também é ativo contra *Malassezia furfur*, *Blastomyces dermatitidis*, agentes da cromoblastomicose, feo-hifomicose e dermatófitos. No entanto, espécies de *Fusarium* e agentes pertencentes a classe dos zigomicetos são pouco sensíveis ao itraconazol^{42,134,145}.

Toxicidade

Dependendo da dose utilizada em mulheres grávidas, pode desenvolver-se toxicidade maternal e embriotoxicidade. Em estudos com animais, observam-se, com frequência, mal formações múltiplas envolvendo o sistema esquelético⁴². Entretanto, existe relato de um caso envolvendo uma paciente com esporotricose linfática que engravidou durante o tratamento com itraconazol; não tendo comunicado a gravidez aos médicos responsáveis pelo tratamento, recebeu a medicação durante 5 meses. A paciente e seu filho foram examinados, após três meses do nascimento, e constatou-se que o bebê não apresentava nenhuma anomalia⁸².

Farmacocinética

O itraconazol é bem absorvido e amplamente distribuído pelo organismo; apresenta altas concentrações teciduais, superiores às encontradas no plasma. Cerca de 99,82% ligam-se às proteínas plasmáticas⁸². É encontrado, em baixas concentrações, no peritônio, no líquido cefalorraquiano e na urina. O nível sérico ainda é discutível e provavelmente pode conter metabólitos. Segundo alguns autores, O pico plasmático, após dose única de 100mg, é de aproximadamente 0,1µg/ml a 0,5µg/ml; estas concentrações dependem do estado geral do paciente^{7,42,135}. O itraconazol é extensivamente metabolizado no fígado e já foram identificados mais de 30 metabólitos. A droga intacta não é excretada na urina, mas 35% dos metabólitos o são; 3 a 18% do itraconazol absorvido, são excretados nas fezes em sua forma primária^{7, 42,61}.

Uso terapêutico

No tratamento de dermatofitoses, a dose diária recomendada é de 100mg durante 15 a 30 dias⁴². Na candidíase vaginal, a dose usual é de 200mg durante três dias, mas pode ser aumentada conforme o grau de infecção ou do estado geral do paciente⁴². A dose de 100mg diárias, durante 3 meses, é efetiva no tratamento da esporotricose^{42,61}. No tratamento de cromoblastomicose, são recomendadas doses diárias de 100 a 200mg por 6 meses; dependendo da gravidade das lesões, o tempo de tratamento pode ser aumentado. Em micoses sistêmicas a dose usual é de 200mg diárias, durante 6 a 8 meses^{7,42,61}.

Reações adversas

Os efeitos observados têm sido, náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, febre, fadiga, tontura, aumento reversível das enzimas hepáticas, desordem menstrual e efeitos alérgicos, como prurido, erupções cutâneas e urticária, além de casos isolados de neuropatia periférica e síndrome de Stevens-Johnson^{7,42,61}.

Interações medicamentosas

A concentração plasmática do itraconazol sofre redução quando administrado em concomitância com rifampicina, fenitoína ou carbamazepina. Essa alteração também ocorre frente a drogas que reduzem a acidez gástrica, como antagonistas H₂, bloqueadores da bomba de prótons e a didanosina que é formulada com tampões que neutralizam o ácido gástrico. O itraconazol eleva as concentrações plasmáticas dos fármacos metabolizados pela enzima CYP3A4 da citocromo P-450, incluindo a digoxina, ciclosporina e a fenitoína. Também pode elevar os níveis da terfenadina e do astemizol, mas pode inibir o metabolismo do varfarina^{7,42,60,145}.

Resistência

Apesar do amplo uso do itraconazol, poucos são os relatos de resistência *in vitro* e *in vivo*. A resistência cruzada, após o uso primário de cetoconazol e fluconazol, foi observada em isolados de *C. albicans* e *Aspergillus fumigatus*^{43,170,171}.

Aumento da concentração inibitória mínima para amostras sequenciais de *Candida* spp, isoladas de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida, também foram observados⁴³. Recentemente, foi relatado caso de resistência *in vitro* e *in vivo* ao itraconazol e a anfotericina B, com óbito de paciente com infecção disseminada por *Trichoderma longibrachiatum*, após transplante de medula óssea¹³⁶.

III - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DOS ANTIFÚNGICOS *IN VITRO*

Antes da década de 50, os testes de susceptibilidade para fungos não eram relevantes e as drogas que apresentavam ação antifúngica eram restritas¹³³. Principalmente após o surgimento da 5-fluorocitosina e relatos de resistência clínica, é que testes de susceptibilidade com antifúngicos começaram a ser pesquisados. Nesse contexto, ressaltou-se a grande disparidade entre as metodologias empregadas em diversos laboratórios de rotina ou pesquisa¹³³.

Nas últimas décadas os testes de susceptibilidade tornaram-se altamente necessários devido ao aumento das infecções fúngicas, ocasionadas por diversos fatores. Entre estes, inclui-se o amplo uso de drogas imunossupressoras e de antibióticos, aumento no número de procedimentos invasivos, doenças crônicas como o diabetes, que facilitam o desenvolvimento de micoses, e o surgimento da síndrome da imunodeficiência adquirida^{56,133}. Durante esse período, porém, verificou-se que os métodos utilizados para detectar a susceptibilidade dos fungos *in vitro* estavam defasados, em comparação com os testes para antibacterianos¹³³. Embora os procedimentos empregados nos primeiros estivessem baseados nesses últimos, a padronização das técnicas era falha. Isto acarretava enormes diferenças nos resultados de concentração inibitória mínima de testes realizados, intra e interlaboratorialmente, com mesmas cepas e antifúngicos^{32,75}.

Em 1982, pesquisadores de vários laboratórios foram convocados pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), com a finalidade de formar um subcomite para a padronização de testes de susceptibilidade para fungos. Em 1985, este grupo publicou relato, no qual apresentava o resultado de um questionário aplicado nos laboratórios que faziam parte do programa. Em geral os laboratórios utilizavam o método de diluição em caldo e testavam leveduras. Com base nestes e em outros dados, iniciaram, então, estudos para a padronização de uma técnica, os quais se desenvolveram em diversas etapas, desde a escolha das drogas até o tempo de leitura do teste. Em dezembro de 1992, o NCCLS publicou o documento M27-P, que padronizava o teste de macrodiluição para *Candida*

spp e *Cryptococcus neoformans*¹¹⁰. Devido à falhas observadas em amplas aplicações do teste, aquele documento foi revisado e modificado em 1997. Outro documento, o M27-A, foi publicado, incluindo a técnica de microdiluição em caldo¹¹¹. A grande vantagem da metodologia preconizada pelo NCCLS é a reprodutibilidade; no entanto, é muito trabalhosa e onerosa, inviabilizando seu uso em rotina¹³³.

Muitos pesquisadores utilizam técnicas adaptadas ao seu laboratório. Na Europa, há grupos que preferem a diluição em ágar, pela vantagem de poder testar várias cepas ao mesmo tempo, além de propiciar melhor aeração para o crescimento dos mesmos^{20,126,144,150,154,167,178}. Desde a década de 1970, essa técnica vem sendo utilizado para determinar a atividade da anfotericina B, frente a fungos filamentosos^{151,152,153}.

Diversos sistemas comerciais têm sido desenvolvidos, e são baseados principalmente na técnica de difusão em ágar ou na de microdiluição em caldo^{33,46}. Atualmente, o produto mais promissor do mercado é uma fita impregnada com diferentes concentrações da droga (Etest, AB Biodisk, Solna, Suécia). O método é quantitativo, de fácil execução, mas é indicado apenas para o estudo de algumas leveduras. Vários trabalhos têm demonstrado correlação com a técnica de diluição em caldo, preconizada pelo NCCLS^{44,46}.

Independente da técnica utilizada, alguns fatores podem prejudicar a interpretação dos resultados. A composição do meio de cultura, tempo e temperatura de incubação, tamanho do inóculo e critério de leitura, são as variáveis mais apontadas como interferentes dos resultados dos testes.

Dependendo da droga em estudo pode haver interferência dos componentes do meio. Assim, por exemplo, as purinas e pirimidinas alteram a atividade antifúngica de 5-fluorocitosina, e os esteróis a atividade dos poliênicos^{101,133}.

A interferência da temperatura foi principalmente observada em testes com anfotericina B. Temperaturas de até 22°C podem aumentar o valor da concentração inibitória mínima da droga e até 34°C podem reduzi-la^{101,133}.

O tamanho do inóculo também pode interferir com os valores da concentração inibitória mínima, como ocorre com os azóis^{44,101,133}.

O tampão utilizado pode ser um importante interferente; TRIS (hidroximetil) aminometano, por exemplo, antagoniza 5-fluorocitosina. O pH do meio pode afetar o crescimento do microrganismo e a atividade das drogas. Em pH próximo de 3,0, a concentração inibitória mínima do cetoconazol pode aumentar em até 100 vezes; pH baixo também interfere nos resultados de testes com anfotericina B^{44,46,101,133}.

A determinação do ponto final para leitura do teste é apontada como importante fonte de discrepância entre os resultados interlaboratoriais, especialmente quando a droga testada é um azol ou, em algumas condições, a 5-fluorocitosina^{46,153}. Segundo alguns autores, a atividade fungistática dos azóis não é prontamente observada, porque a interação com o sítio alvo no fungo não é imediata^{44,46}. Assim, existe um crescimento residual do fungo até que a droga comece a agir. Este crescimento, denominado "*trailing*", dificulta a leitura do teste. Nestas condições, o NCCLS recomenda que a concentração inibitória mínima seja considerada como a concentração que inibiu 80% do crescimento do microrganismo nos testes de macrodiluição em caldo e 50% nos de microdiluição^{110,111}. Esta leitura é muito subjetiva, induzindo significativas diferenças entre os resultados obtidos.

Na eleição de uma técnica, deve-se considerar o campo da aplicação da mesma: pesquisa ou rotina. Também deve-se direcionar a escolha da droga a ser testada, levando em conta o fungo e a infecção por ele causada, pois nem todos os antifúngicos agem contra todos os fungos, ou alcançam níveis adequados em todas as áreas corpóreas.

Testes de suscetibilidade para agentes da cromoblastomicose

Os testes de suscetibilidade para fungos filamentosos são bem menos pesquisados que os elaborados para leveduras. Este fato se deve as próprias características desses fungos, as quais dificultam a padronização dos testes⁴⁴. Os bolores são organismos multicelulares, morfológicamente complexos, apresentando variedades de formas e dimensões celulares. Várias técnicas têm sido utilizadas para estudo da sensibilidade dos bolores frente a diversos antifúngicos, incluindo procedimento, que representa uma tentativa de padronização, desenvolvida pelo mesmo grupo, que padronizou a técnica para leveduras no NCCLS⁴⁵. Diversos autores têm utilizado outras técnicas, como a de diluição em ágar e os resultados obtidos têm sido considerados compatíveis com o esperado^{20,35,47,173,178}. Testes com fungos demácios são escassos, especialmente para os agentes de cromoblastomicose. Estudos mais antigos foram realizados utilizando –se a técnica de diluição em ágar, onde os autores testaram 5-fluorocitosina e butil-simpatol (vasculat)¹³⁰. Neste ensaio o resultado de resistência *in vitro* a 5-fluorocitosina, foi compatível com a resposta clínica¹³⁰. Nenhuma sensibilidade foi registrada no ensaio com butil-simpatol e, estes mesmos autores relataram em outra publicação a falha terapêutica observada em um de seus pacientes com esta droga⁹⁰. Portanto não foi possível correlacionar os testes *in vitro* com os *in vivo*. Posteriormente foram conduzidos testes com a técnica de diluição em caldo com anfotericina B, 5-fluorocitosina e tiabendazol, isoladamente ou em associação^{127,128}. Os resultados demonstraram sinergismo entre anfotericina B e 5-fluorocitosina e efeito aditivo entre anfotericina B e tiabendazol. Esses resultados também foram compatíveis com os observados na clínica. Em 1982, Corrado e colaboradores³⁰ utilizaram a técnica de diluição em caldo com yeast nitrogen base e verificaram resistência nas cepas estudadas contra 5-fluorocitosina, anfotericina B, rifampicina, cetoconazol e miconazol. No entanto, observaram que, para alguns isolados, apenas o cetoconazol e a anfotericina B estavam em concentrações séricas utilizadas na terapia. A

associação sinérgica com baixas concentrações de cetoconazol e 5-fluorocitosina foi destacada neste estudo. A técnica de diluição em ágar foi empregada novamente por Ingroff ⁴⁷ e colaboradores em 1984 em estudo com vários agentes, entre eles, os da cromoblastomicose. A resistência destes *in vitro* contra cetoconazol, itraconazol, BAY n7133 e RO 14-4764/002, também foi comprovada por esses autores. Os estudos realizados nos últimos anos com a técnica de diluição em caldo apresentam resultados controvertidos^{6,30,98,100,129}. Além da falta de padronização da técnica, a determinação de sensibilidade e resistência varia de autor para autor, dificultando desta maneira estabelecer perfis de sensibilidade dos agentes da cromoblastomicose contra diferentes antifúngicos. Além disto, a maioria dos trabalhos foi realizada com cepas de coleção de cultura, não envolvendo também cepas recém isoladas e amostras seriadas que pudessem levar a correlação de resultados *in vivo* e *in vitro*.

IV - PROPOSIÇÕES E OBJETIVOS

Considerando-se a:

- epidemiologia da cromoblastomicose no Brasil
- falha terapêutica relatada por diversos autores
- carência de amplos estudos *in vitro* relacionados aos fungos demácios
- ausência de teste de suscetibilidade padrão para fungos demácios,

estabeleceu-se os objetivos seguintes

- padronizar a técnica de diluição em ágar para fungos demácios,
- determinar os perfis de suscetibilidade de agentes da cromoblastomicose, frente a alguns antifúngicos,
- estabelecer possível correlação dos resultados obtidos a partir dos testes realizados com amostras seriadas *in vitro* com os observados nos pacientes.

V - MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho é parte de um plano de pesquisa realizado em colaboração com profissionais da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, assim como, do Núcleo Gestão Assistencial de Registro, do Hospital das Clínicas da Faculdade Federal de Mato Grosso do Sul, do Instituto Adolfo Lutz-regional de Sorocaba e do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo.

1. Pacientes

Foram selecionados 18 pacientes atendidos nessas instituições, com suspeita clínica de cromoblastomicose ou com doença confirmada.

2. Microrganismos

As cepas foram numeradas no momento de sua aquisição. De 43 cepas obtidas, 39 foram validadas para os testes de suscetibilidade. As outras encontravam-se contaminadas ou a identificação realizada não foi compatível com a referência de origem.

Entre as 39 cepas em estudo, 27 foram obtidas, de modo seriado ou não, dos pacientes atendidos nas diversas instituições supra citadas. O isolamento das mesmas ocorreu em um período máximo de 6 meses antes do início da realização dos testes de suscetibilidade.

As amostras provenientes de coleções de culturas, 12, foram gentilmente cedidas pelo Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo ou pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo; 7 delas estavam identificadas como *P. verrucosa*, 2 como *F. pedrosoi* e cada uma das seguintes como: *C. carrionii*, *R. aquaspersa* ou *F. compacta*.

A cepa padrão utilizada nos testes, foi *Candida parapsilosis* ATCC 22019, para a qual as concentrações inibitórias mínimas do itraconazol, fluconazol, cetoconazol, anfotericina B e 5-fluorocitosina, são conhecidas^{120,132}.

Os microrganismos em estudo foram mantidos em ágar dextrose batata, com repiques sucessivos de três meses. Para inclusão nos testes de suscetibilidade, os repiques foram realizados a cada 14 dias e incubados a

30°C. A cepa padrão foi mantida em ágar Sabouraud e repicada 24 horas antes dos testes de suscetibilidade.

3. Exames micológicos

3.1. Exame direto

As amostras para análise foram obtidas por meio de raspagem com lâminas de bisturi, das lesões dos pacientes. Uma parte do material biológico foi clarificado com hidróxido de potássio a 20% e, em seguida, examinado ao microscópio óptico.

3.2. Cultura

Outras frações do material biológico foram respectivamente semeadas em ágar Sabouraud, acrescido de cloranfenicol, e em ágar Mycobiotic. A incubação foi realizada a 30°C, por até 30 dias. As colônias, assim desenvolvidas, foram repicadas em ágar batata e cultivadas em lâmina (técnica de Riddell, 1950)¹³⁷, para melhor observação micromorfológica. A partir desta, foram realizadas um total de 24 identificações.

4. Padronização do inóculo

A fim de se estabelecer a idade dos cultivos para preparação dos inóculos, determinou-se a curva de crescimento de 5 cepas, escolhidas ao acaso entre as isoladas dos pacientes (18, 28 e 35) e as oriundas de coleções (11 e 12). Cada curva foi obtida com base em contagens; em câmara de Neubauer, do número de células contidas em uma suspensão, preparada a partir de colônias respectivamente com 7, 14, 18 e 21 dias de crescimento em ágar batata a 30°C.

As contagens foram acompanhadas de exames da micromorfologia dos fungos, para se ter noção da proporção entre células vegetativas e germinativas em cada período estudado. Essas observações foram realizadas em montagens preparadas com fragmentos das colônias em lactofenol-azul de algodão.

Considerando-se os diferentes períodos de crescimento, estudou-se também a influência da concentração do inóculo sobre os resultados dos testes de suscetibilidade com anfotericina B, utilizada como droga de eleição para o estudo em questão. Para obtenção dos inóculos de cada uma das cepas incluídas no teste, foram selecionadas colônias com determinado tempo de incubação. A partir destas, foram preparadas diferentes suspensões, com variações de 10 vezes ou mais na concentração celular.

5. Drogas

Foram utilizados produtos comercialmente disponíveis sob a forma injetável, tendo como princípio ativo a anfotericina B (Fungizon^R, BRYSTOL MEYERS SQUIBB, Indústria Química S/A, São Paulo, Brasil lotes 97403 e 121595), contendo em cada frasco 50mg de droga, ou o Fluconazol (Soluflex^R, LABORATÓRIOS P. L. RIVERO Y CIA. S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina lote 0120777), contendo 200mg em cada bolsa para infusão venosa. A anfotericina B e o fluconazol foram conservados a 4°C. As demais drogas, adquiridas sob a forma de pó, incluíram itraconazol, JANSSEN PHARMACEUTICA N.V., Beerse, Bélgica (lote ZR051211PUB381), terbinafina, NOVARTIS (lote 25/11/97), 5-fluorocitosina, SIGMA – ALDRICH CHIMIE – Alemanha (lote 85H4068) e cetoconazol, JANSSEN PHARMACEUTICA N.V. Beerse, Bélgica (lote 22/07/1998), conservadas em dessecador, a vácuo, a 4°C. Todos os prazos de validade foram respeitados.

Obs.: As substâncias cujas procedências não constam no texto, foram provenientes da Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA e/ou da E. Merk, Darmstadt, Germany e/ou da Oxoid, Hampshire, England e/ou da Sigma, St. Louis.

6. Meios de cultura e soluções

6.1. Ágar Sabouraud Dextrose (ASD)

Este meio foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e autoclavado a 120°C por 15 minutos.

Para manutenção da cepa controle, volumes de 5ml foram distribuídos em tubos de ensaio (10mm x 145mm), esterilizados e geleificados em posição inclinada.

Para estudo da concentração fungicida mínima (CFM), 20ml do meio, esterilizado foram vertidos em cada placa de Petri (15 x 100mm).

6.2. Ágar Sabouraud com cloranfenicol

Dissolveu-se 100mg do antibiótico em 10ml de álcool (95°GL). Esta solução foi adicionada ao meio de cultura, preparado segundo especificações do fabricante. Em seguida, volumes de 5ml foram distribuídos em tubos de ensaio (15mm x 125mm), autoclavados a 120°C por 15 minutos e geleificados em posição inclinada. A conservação foi realizada a 4°C.

Este meio foi utilizado para isolamento dos fungos a partir do material biológico.

6.3. Mycobiotic ágar

O meio foi preparado segundo instruções do fabricante. Volumes de 5ml foram distribuídos em tubos de ensaio (15mm x 125mm), autoclavados a 120°C durante 15 minutos, e geleificados em posição inclinada.

Este meio também foi utilizado para o isolamento dos fungos a partir do material biológico.

6.4. Ágar batata

O meio foi preparado segundo as especificações do fabricante. Volumes de 5ml foram distribuídos em tubos de ensaio (15mm x 125mm), autoclavados a 120°C durante 15 minutos, e geleificados em posição inclinada. A conservação do mesmo foi realizada a 4°C.

Este meio foi utilizado para manutenção, e identificação macro e microscópica dos fungos isolados do material biológico.

6.5. Caldo YNBP

Composição:

- Meio de reserva _____ 100ml
- Tampão de fosfato (>0,01M) _____ 900ml

Preparação:

Em condições estéreis, o meio de reserva foi adicionado ao tampão de fosfato, e a preparação foi conservada a 4°C.

Este caldo foi utilizado nos testes de suscetibilidade para diluição das drogas.

6.6. Tampão de fosfato (> 0,01M)

Composição:

- NaH_2PO_4 _____ 0,33 g
- K_2HPO_4 _____ 0,92 g
- água destilada _____ 900 ml

Preparação:

Os componentes fosfatados foram dissolvidos na água e, quando necessário, o pH foi ajustado a 7,0 com NaOH 1N. A solução foi autoclavada a 120°C, durante 15 minutos, e conservada a 4°C.

Esta solução foi utilizada na preparação do caldo YNBP.

6.7. Meio de reserva:

Composição:

- Yeast Nitrogen Base (YNB) _____ 6,7g
- L- asparagina _____ 1,5g
- glicose _____ 10g
- tampão de fosfato (0,01M) _____ 100ml

Preparação:

Os componentes sólidos foram dissolvidos no tampão de fosfato levemente aquecido e a solução resultante, após esterilização por filtração, foi conservada, em frasco esterilizado, a 4°C.

Este meio foi utilizado na preparação do ágar YNBP e do caldo YNBP.

6.8. Ágar tampão de fosfato:

Composição:

- NaH_2PO_4 _____ 0,33 g
- K_2HPO_4 _____ 0,92 g
- ágar _____ 11,0 g
- água destilada q.s.p. _____ 900 ml

Preparação:

O ágar foi adicionado à água e a mistura resultante foi aquecida até ebulição. Os componentes fosfatados foram então adicionados e, após homogeneização, o pH foi ajustado a 7,0 com NaOH 1N. Volumes de 17 ml de meio foram distribuídos em frascos de penicilina os quais foram lacrados. Após autoclavagem a 120°C, durante 15 minutos, os frascos foram conservados a 4°C

Este meio foi utilizado na preparação do ágar YNBP, no momento da execução do teste..

6.9. Tampão de fosfato com Tween 80

Composição:

- Tampão de fosfato 0,01M _____ 500 ml
- Tween 80 _____ 0,25 ml

Preparação

O tampão, levemente aquecido, foi adicionado ao Tween 80. Em seguida, 5ml ou 9ml foram distribuídos em tubos de ensaio e autoclavados a 120°C por 15 minutos.

Volumes de 5ml foram utilizados na preparação do inóculo e os volumes de 9 ml foram utilizados na diluição do inóculo.

6.10. Tampão de Fosfato (0,01M)

Composição:

- NaH_2PO_4 _____ 0,33 g
- K_2HPO_4 _____ 0,92 g
- água destilada _____ 1000 ml

Preparação:

Os componentes fosfatados foram dissolvidos na água destilada. Quando necessário, o pH foi ajustado a 7,0 com NaOH 1N. A solução foi autoclavada a 120°C, durante 15 minutos, e conservada a 4°C.

Esta solução foi utilizada na preparação do meio de reserva e na solução com Tween 80.

7. Antifungigrama pela técnica de diluição em ágar

Os testes foram realizados pela técnica de diluição em ágar, segundo metodologia de Soares e Cury^{162,163} e esta foi modificada, a fim de atender as diferenças morfológicas e bioquímicas relacionadas com os fungos demácios.

7.1. Diluições das drogas

A anfotericina B, o fluconazol e a 5-fluorocitosina foram diluídos em água destilada esterilizada, a fim de se obter concentrações de 1000µg/ml, 1000µg/ml e 2000µg/ml, respectivamente. Volumes de 10ml destas, foram distribuídos em tubos de ensaio, mantidas a -20°C e utilizadas como reserva. A partir destas, foram realizadas diluições seriadas, ao dobro, em caldo YNBP. Para anfotericina B, a variação das concentrações foi de 1280µg/ml a 5µg/ml, a fim de se obter nos testes de concentração inibitória mínima 64µg/ml a 0,25µg/ml. As concentrações do fluconazol, variaram de 256µg/ml a 5µg/ml nessas soluções e nos testes foram de 128µg/ml a 0,25µg/ml. Para 5-fluorocitosina foram preparadas diluições contendo de

2000µg/ml a 6µg/ml da droga, a partir das quais foram obtidas concentrações de 100µg/ml e 0,3µg/ml, nos testes.

A solução de reserva da terbinafina, do cetoconazol ou do itraconazol, preparada em dimetilssulfóxido (DMSO), continha 1000µg/ml da droga. Volumes de 10 ml foram distribuídos em tubos de ensaio e conservados a -20°C. A partir dessa solução, foram preparadas diluições seriadas ao dobro, em caldo YNBP. Nessas condições as concentrações da terbinafina variaram de 480µg/ml a 1,8µg/ml e nos testes de concentração inibitória mínima foram de 24µg/ml a 0,09µg/ml. Para o cetoconazol e o itraconazol foram preparadas soluções com 640µg/ml a 2,5µg/ml da droga, cuja concentrações nos testes variaram de 32µg/ml a 0,125µg/ml.

A partir de cada diluição da droga, foram transferidos 2 ml para um tubo contendo 1,0 ml de meio de reserva; e a mistura foi homogeneizada e mantida a -20°C até o momento da execução do teste de suscetibilidade.

7.2. Inóculo

Com base nos resultados obtidos em estudos preliminares, adotou-se, como inóculo, suspensão contendo, em cada ml, cerca de 4×10^4 células, com 14 dias de crescimento em ágar batata a 30°C. A cepa controle *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada com 24 horas de crescimento em ágar Sabouraud a 30°C.

Preparação

Com auxílio de alça em anel, a superfície da colônia do fungo em estudo foi cuidadosamente raspada e transferida para tubo contendo 5 ml de água e 4 pérolas de vidro. O tubo foi submetido à agitação vigorosa em vortex por 1 minuto, a fim de se obter separação ótima das células hifálicas. A suspensão resultante foi centrifugada a 1500rpm, durante 15 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado duas vezes, sob centrifugação, com 3 ml de água e finalmente resuspenso em 5 ml de tampão de fosfato contendo Tween 80.

Volume de 1 ml foi transferido para tubo com 9 ml desse tampão e a suspensão foi ajustada para conter 200 células em 5µl ou 4×10^4 células/ml. A partir de ensaios preliminares, foi possível verificar que essa concentração de células, alcançada com auxílio de câmara de Neubauer, possuía turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Assim, nos testes posteriores, o ajuste do inóculo foi realizado por meio de comparação da turvação com esse padrão.

7.3. Execução do teste de concentração inibitória mínima (CIM)

As diferentes diluições do antifúngico foram descongeladas e o ágar tampão fosfato foi fundido e estabilizado a temperatura de 56°C. Volume de 3ml de cada diluição foi adicionada a 17ml de meio; a mistura foi homogeneizada e vertida em placa de Petri. Após geleificação dos meios nas placas, 5µl de cada inóculo foram aplicados no meio de ágar. Esse procedimento permitiu a aplicação de 24 inóculos por placa. Estas foram mantidas à temperatura ambiente até completa absorção dos inóculos e, em seguida, colocadas a 30°C até crescimento das cepas no controle sem droga (positivo), que geralmente ocorreu entre o 3º e o 4º dia de incubação, a última leitura era realizada no 7º dia. O CIM para a cepa controle era determinado com 24 horas de incubação.

No teste foram utilizadas, três placas adicionais, contendo, respectivamente, caldo YNBP e ágar YNBP(3:17), como controle de crescimento positivo, DMSO a 0,1% e ágar YNBP (3:17), para controle de interferência do solvente e formaldeído a 0,5% e ágar YNB (3:17), como controle de crescimento negativo

Foi considerada concentração inibitória mínima, a menor concentração da droga que impediu visível crescimento de um determinado fungo.

7.4. Execução do teste de concentração fungicida mínima (CFM)

Os inóculos que não apresentaram desenvolvimento visível no teste de CIM, foram removidos, por raspagem cuidadosa, com auxílio de alça em anel, e semeados em placas de ágar Sabouraud. As placas foram mantidas a 30°C durante 14 dias.

Foi considerada concentração fungicida mínima, a menor concentração da droga que impediu visível crescimento do subcultivo de um determinado fungo.

7.5. Interpretação dos resultados

O valor final da CIM ou da CFM de cada droga, frente a uma determinada cepa, foi obtido por meio da média geométrica dos valores encontrados no teste realizado em triplicata.

O estabelecimento de sensibilidade ou de resistência das cepas frente as drogas em estudo, foi baseado nos níveis séricos alcançados pelas drogas^{7,135}. Assim, foram consideradas sensíveis a anfotericina B as cepas que responderam a CIMs e/ou CFMs $\leq 2,0\mu\text{g/ml}$, ao itraconazol as que responderam a $\leq 0,5\mu\text{g/ml}$, ao fluconazol as que responderam a $\leq 8,0\mu\text{g/ml}$, a 5-fluorocitosina a $\leq 50\mu\text{g/ml}$, a terbinafina a $\leq 1,5\mu\text{g/ml}$ e ao cetoconazol a $\leq 8\mu\text{g/ml}$.

VI - RESULTADOS

A tabela 1 indica os resultados das análises realizadas a partir das amostras obtidas dos pacientes incluídos neste estudo. Todos os exames diretos, foram positivos para a presença de células muriformes. Em três amostras (23, 25 e 27), também foram observadas numerosas hifas demaciadas. O fungo isolado em todos os casos foi *F. pedrosoi*. Todas apresentaram células muriformes no exame direto e as culturas isoladas foram identificadas também como *F. pedrosoi*.

As curvas de crescimento, obtidas para as diferentes cepas de *F. pedrosoi*, mostraram perfis similares. Com base na teoria dos mínimos quadrados, verificou-se que, para qualquer delas, o desenvolvimento colonial alcançou até o 14º dia de incubação. Entre esse período e o 21º dia, observou-se tendência à estabilização do crescimento, seguindo-se acentuada redução do mesmo em períodos superiores (Figura 3).

Nas observações micromorfológicas dos períodos de desenvolvimento, verificou-se que até o 7º dia de crescimento havia intensa produção de células vegetativas com desenvolvimento de raros conídios. Entre o 7º e o 14º dias ocorria pequena produção de células vegetativas com acentuada formação de conídios. Entre os 14º dia e 21º dias observou-se pequena produção de células vegetativas e intensa formação de conídios. A redução do número de células vegetativas e de conídios anteriormente formados, foi evidenciada entre o 21º e o 35º dias de incubação.

A tabela 2 inclui os dados obtidos em estudo preliminar, para comprovação da interferência de variações no inóculo sobre os resultados das CIMs da anfotericina B. Frente a maioria das cepas selecionadas, os resultados desses testes foram independentes dos fatores analisados, ou seja, tamanho do inóculo e idade das células utilizadas na preparação do mesmo. De modo geral, os valores das CIMs mantiveram-se acima das concentrações incluídas no teste. Foram exceções as cepas 21, 28, 32 e 33, frente as quais as CIMs do poliênico sofreram variações dependentes de um daqueles fatores ou de ambos os fatores.

Considerando-se os resultados das pesquisas preliminares, optou-se por inóculo com cerca de 4×10^4 células/ml, preparado a partir de cultura com 14 dias de incubação, para aplicação nos estudos seguintes.

A leitura dos testes de CIM, tomando-se como parâmetro o controle de crescimento de cada cepa no meio sem droga, mostrou que os resultados dessa prova poderiam ser completados a partir do 3º ou do 7º dia do início da incubação. Com base no nível sérico de cada droga, verificou-se que todas as cepas foram sensíveis ao cetoconazol, apenas uma cepa (12) foi sensível a anfotericina B, 14 foram sensíveis ao itraconazol, 7 o foram a 5-fluorocitosina e 34 a terbinafina. Todas as cepas foram resistentes ao fluconazol e 3 delas (3, 7 e 11) o foram a todas as drogas, exceto ao cetoconazol (Tabela 3).

Os resultados dos testes de CFM mostraram que somente uma amostra foi sensível à atividade letal do itraconazol (13) ou a da 5-fluorocitosina (9) , 22 o foram a da terbinafina e 25 a do cetoconazol. Nenhuma cepa respondeu a atividade letal da anfotericina B ou do fluconazol (Tabela 4).

A tabela 5 ilustra os resultados do teste de CIMs obtidos com amostras seriadas de 6 pacientes. Todos os isolados foram resistentes a anfotericina B, assim como, ao fluconazol, mas sensíveis à terbinafina e ao cetoconazol. Apenas uma cepa (20), recuperada da primeira amostra de um paciente (3), foi sensível à 5-fluorocitosina. Merecem destaque os dados obtidos no teste com itraconazol. Neste caso, entre as 6 cepas inicialmente isoladas, 3 (19, 26 e 34) mostraram resistência ao azol; duas dessas eram oriundas de paciente em tratamento apenas com itraconazol (2) ou com o mesmo associado à crioterapia (4), e a terceira foi isolada de paciente (5) sem qualquer tratamento. Para as amostras sequenciais, obtidas durante tratamento continuado ou após início da terapia, verificou-se que as cepas de dois pacientes (2 e 4) também foram resistentes ao itraconazol, mas determinaram valores de CIMs superiores as dos primeiros isolados. Em outros dois casos (3 e 6), as cepas obtidas após início do tratamento, responderam à CIMs equivalentes à resistência ao itraconazol, ao contrário

das inicialmente analisadas. Além disso, as cepas sequenciais de um paciente (2), mostraram aumento de CIM não só para o itraconazol, como também para o fluconazol. Em outro paciente (6), os aumentos de CIMs e CFMs das cepas dos isolados posteriores ocorreram para itraconazol, anfotericina B e cetoconazol.

Observações clínicas indicaram que dois (2 e 3) dos seis pacientes tratados com aquele triazol, não apresentaram melhora clínica. Os testes de suscetibilidade, mostraram que a cepa sensível à atividade inibitória da 5-fluorocitosina, não o era à atividade letal da droga. O mesmo comportamento foi observado para 4 isolados (cepas 28, 32, 20 e 36) frente ao itraconazol, mas entre as 14 cepas sequenciais, somente 5 foram resistentes à ação fungicida da terbinafina e 6 o foram ao cetoconazol (tabela 5).

Os resultados de CIMs, para amostras não seriadas, podem ser observados na tabela 6. Todas as cepas isoladas de 11 pacientes, não responderam a anfotericina B e ao fluconazol, mas responderam ao cetoconazol; 7 foram resistentes ao itraconazol, duas o foram à terbinafina (13 e 24) e 10 a 5-fluorocitosina. Quanto aos resultados das CFMs (tabela 6), verificou-se que, entre as 5 cepas sensíveis à ação fungistática do itraconazol, apenas uma o era à atividade letal. Cinco cepas foram consideradas resistentes ao cetoconazol. Não foi observada sensibilidade à 5-fluorocitosina e quanto a terbinafina 7 dos 10 isolados considerados sensíveis a mesma no teste de CIM, também o foram no teste de CFM.

Os valores de CIMs, obtidos frente as 12 cepas oriundas de coleções, mostraram que todas eram sensíveis ao cetoconazol, mas resistentes ao fluconazol; 11 delas também não responderam a anfotericina B, 7 ao itraconazol, 8 a 5-fluorocitosina e 4 a terbinafina. Duas (3 e 7) das três cepas isoladas de amostras de solo e uma (11) obtida de paciente, foram resistentes a todos os antifúngicos estudados, exceto ao cetoconazol (Tabela 7). Entre as cepas consideradas sensíveis, a atividade inibitória das drogas, apenas uma também o foi no teste de CFM frente à 5-fluorocitosina, 4 à terbinafina e 10 o foram ao cetoconazol (tabela 7).

Para a cepa padrão, os valores de CIMs das drogas em estudo foram como segue: anfotericina B 1,0 μ g/ml, fluconazol 2,0 a 8,0 μ g/ml, itraconazol 0,25 μ g/ml, 5-fluorocitosina 0,5 μ g/ml, terbinafina 6,0 μ g/ml e cetoconazol 0,125 μ g/ml.

Tabela 1 - Exames micológicos realizados nas amostras isoladas de 18 pacientes com cromoblastomicose atendidos em diversas instituições

Paciente (n°)	Procedência	Exame direto	Identificação	Cepa (n°)
1	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	28
1	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	32
2	Hospital das Clínicas	células muriformes e hifas	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	27
2	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	29
2	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	30
3	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	20
3	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	22
3	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	31
4	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	26
4	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	41
5	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	34
5	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	35
5	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	43
6	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	36
7	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	13
8	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	17
9	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	18
10	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	21
11	Registro	células muriformes e hifas	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	23
11	Registro	células muriformes e hifas	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	25
12	Mato Grosso	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	24
14	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	33
15	Hospital das Clínicas	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	37
16	Sorocaba	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	38
17	Instituto Adolfo Lutz	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	39
18	Registro	células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	42

Tabela 2 - Influência da concentração do inóculo de 12 cepas de *F. pedrosoi* sobre a atividade inibitória da anfotericina B.

Cepa*	Inóculo / 7 dias	CIM**	Inóculo / 14 dias	CIM	Inóculo / 21 dias	CIM
17 ₁	8,7x10 ⁴ cel/ml	16	3,4x10 ⁵ cel/ml	16	4,47x10 ⁵ cel/ml	16
17 ₂	2,7x10 ⁴ cel/ml	16	5,7x10 ⁴ cel/ml	16	2,4x10 ⁴ cel/ml	16
19 ₁	2,0x10 ⁵ cel/ml	>64	2,8x10 ⁵ cel/ml	>64	1,42x10 ⁵ cel/ml	>64
19 ₂	3,7x10 ⁴ cel/ml	>64	4,5x10 ⁴ cel/ml	>64	1,1x10 ⁴ cel/ml	>64
20 ₁	6,0x10 ⁵ cel/ml	>64	5,8x10 ⁵ cel/ml	>64	8,1x10 ⁵ cel/ml	>64
20 ₂	5,7x10 ⁴ cel/ml	>64	7,7x10 ⁴ cel/ml	>64	5,0x10 ⁴ cel/ml	>64
21 ₁	1,1x10 ⁵ cel/ml	16	1,9x10 ⁵ cel/ml	>64	1,8x10 ⁵ cel/ml	>64
21 ₂	2,2x10 ⁴ cel/ml	16	3,0x10 ⁴ cel/ml	4	1,2x10 ⁴ cel/ml	4
22 ₁	6,0x10 ⁵ cel/ml	>64	5,3x10 ⁵ cel/ml	>64	5,0x10 ⁴ cel/ml	>64
22 ₂	8,7x10 ⁴ cel/ml	>64	7,7x10 ⁴ cel/ml	>64	7,3x10 ⁴ cel/ml	>64
23 ₁	2,4x10 ⁵ cel/ml	>64	2,9x10 ⁵ cel/ml	>64	2,0x10 ⁵ cel/ml	>64
23 ₂	7,0x10 ⁴ cel/ml	>64	5,5x10 ⁴ cel/ml	>64	6,0x10 ⁴ cel/ml	>64
28 ₁	7,5x10 ⁴ cel/ml	>64	8,0x10 ⁴ cel/ml	32	1,0x10 ⁵ cel/ml	64
28 ₂	2,0x10 ⁴ cel/ml	>64	2,5x10 ⁴ cel/ml	4	2,2x10 ⁴ cel/ml	8
29 ₁	2,3x10 ⁵ cel/ml	>64	1,8x10 ⁵ cel/ml	>64	2,0x10 ⁵ cel/ml	64
29 ₂	2,5x10 ⁴ cel/ml	>64	3,7x10 ⁴ cel/ml	>64	7,0x10 ³ cel/ml	32
32 ₁	2,0x10 ⁵ cel/ml	32	1,0x10 ⁵ cel/ml	16	1,2x10 ⁵ cel/ml	16
32 ₂	3,0x10 ⁴ cel/ml	32	5,0x10 ³ cel/ml	8	2,2x10 ⁴ cel/ml	4
33 ₁	1,9x10 ⁵ cel/ml	64	1,0x10 ⁵ cel/ml	4	4,0x10 ⁴ cel/ml	32
33 ₂	3,0x10 ⁴ cel/ml	8	1,2x10 ⁴ cel/ml	4	7,0x10 ³ cel/ml	4
34 ₁	2,3x10 ⁵ cel/ml	>64	1,8x10 ⁵ cel/ml	>64	8,0x10 ⁴ cel/ml	>64
34 ₂	1,2x10 ⁵ cel/ml	>64	2,7x10 ⁴ cel/ml	>64	2,7x10 ⁴ cel/ml	>64
35 ₁	4,4x10 ⁵ cel/ml	>64	4,8x10 ⁵ cel/ml	>64	8,7x10 ⁴ cel/ml	>64
35 ₂	2,5x10 ⁴ cel/ml	>64	7,5x10 ⁴ cel/ml	>64	1,2x10 ⁴ cel/ml	>64

*cep₁: indica o inóculo concentrado; cep₂: indica o inóculo diluído 1/10;

**CIM: concentração inibitória mínima, em µg/ml

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/ml}$) de diferentes antifúngicos frente as 39 cepas de agentes de cromoblastomicose

cepa nº	fungos	AnB*	Itra*	Fluco*	5-FC*	Terb*	Ceto*
1	<i>P. verrucosa</i>	4	0,25	>128	12,5	0,18	$\leq 0,125$
2	<i>C. carrionii</i>	8	0,3	>128	12,5	0,75	$\leq 0,125$
3	<i>P. verrucosa</i>	>64	6,35	>128	>100	24	1
4	<i>F. pedrosoi</i>	45,3	0,42	>128	>100	0,18	$\leq 0,125$
5	<i>P. verrucosa</i>	10	$\leq 0,125$	>128	70,71	0,18	0,35
6	<i>R. aquaspersa</i>	>64	0,6	>128	>100	0,37	0,50
7	<i>P. verrucosa</i>	>64	>32	>128	>100	2,12	8
8	<i>F. compacta</i>	22,68	0,6	>128	>100	0,12	0,35
9	<i>P. verrucosa</i>	32	1	>128	3	1,46	1
10	<i>P. verrucosa</i>	12,7	5	>128	6	0,36	0,5
11	<i>F. pedrosoi</i>	16	0,63	>128	>100	24	0,25
12	<i>F. pedrosoi</i>	0,8	$\leq 0,125$	>128	>100	24	$\leq 0,125$
13	<i>F. pedrosoi</i>	12,7	$\leq 0,125$	>128	62,99	2	0,25
17	<i>F. pedrosoi</i>	16	$\leq 0,125$	64	100	$\leq 0,09$	0,25
18	<i>F. pedrosoi</i>	>64	0,7	>128	100	$\leq 0,09$	0,35
19	<i>F. pedrosoi</i>	>64	1	64	100	0,12	0,5
20	<i>F. pedrosoi</i>	>64	0,3	>128	12,5	$\leq 0,09$	0,35
21	<i>F. pedrosoi</i>	4,6	0,35	64	12,5	0,6	0,25
22	<i>F. pedrosoi</i>	>64	5,7	>128	>100	$\leq 0,09$	0,35
23	<i>F. pedrosoi</i>	>64	8	>128	>100	0,5	0,25
24	<i>F. pedrosoi</i>	45	1	64	>100	0,5	0,25
25	<i>F. pedrosoi</i>	>64	1,4	>128	>100	$\leq 0,09$	0,5
26	<i>F. pedrosoi</i>	>64	2,5	>128	>100	0,12	0,35
27	<i>F. pedrosoi</i>	>64	4	>128	>100	$\leq 0,09$	0,35
28	<i>F. pedrosoi</i>	4,1	0,35	>128	100	0,18	0,25
29	<i>F. pedrosoi</i>	>64	4	>128	>100	$\leq 0,09$	0,25
30	<i>F. pedrosoi</i>	>64	5,6	>128	>100	$\leq 0,09$	0,5
31	<i>F. pedrosoi</i>	>64	4	>128	>100	$\leq 0,09$	0,25
32	<i>F. pedrosoi</i>	5	0,17	>128	100	$\leq 0,09$	0,25
33	<i>F. pedrosoi</i>	4	$\leq 0,125$	>128	50	$\leq 0,09$	0,25
34	<i>F. pedrosoi</i>	>64	2,0	>128	>100	$\leq 0,09$	0,5
35	<i>F. pedrosoi</i>	>64	1,4	>128	>100	$\leq 0,09$	0,25
36	<i>F. pedrosoi</i>	45	0,14	>128	>100	$\leq 0,09$	0,5
37	<i>F. pedrosoi</i>	>64	4	>128	100	$\leq 0,09$	0,25
38	<i>F. pedrosoi</i>	32	0,35	>128	>100	$\leq 0,09$	0,5
39	<i>F. pedrosoi</i>	50,8	1	64	>100	$\leq 0,09$	0,25
41	<i>F. pedrosoi</i>	32	5,6	>128	>100	0,10	0,5
42	<i>F. pedrosoi</i>	>64	0,8	64	>100	$\leq 0,09$	0,25
43	<i>F. pedrosoi</i>	>64	5,6	>128	>100	$\leq 0,09$	2

* AnB: anfotericina B; Itra: itraconazol; Fluco: fluconazol; 5-FC: 5-fluorocitosina; Terb: terbinafina; Ceto: cetoconazol

Tabela 4 - Concentração fungicida mínima ($\mu\text{g/ml}$) de diferentes antifúngicos frente as 39 cepas de agentes de cromoblastomicose

cepa nº	fungos	AnB*	Itra*	Fluco*	5-FC*	Terb*	Ceto*
1	<i>P. verrucosa</i>	64	16	nr**	>100	0,75	0,5
2	<i>C. carrionii</i>	32	16	nr	>100	0,75	$\leq 0,125$
3	<i>P. verrucosa</i>	nr	>32	nr	nr	24	2
4	<i>F. pedrosoi</i>	>64	32	nr	nr	0,3	0,5
5	<i>P. verrucosa</i>	>64	32	nr	100	24	8
6	<i>R. aquaspersa</i>	nr	32	nr	nr	24	>32
7	<i>P. verrucosa</i>	nr	nr	nr	nr	>24	16
8	<i>F. compacta</i>	>64	>32	nr	nr	12	2
9	<i>P. verrucosa</i>	>64	32	nr	25	24	2
10	<i>P. verrucosa</i>	>64	32	nr	>100	1,5	2
11	<i>F. pedrosoi</i>	64	2	nr	nr	24	0,5
12	<i>F. pedrosoi</i>	64	32	nr	nr	24	0,5
13	<i>F. pedrosoi</i>	64	$\leq 0,125$	nr	>100	>24	0,5
17	<i>F. pedrosoi</i>	64	32	>128	100	0,18	0,5
18	<i>F. pedrosoi</i>	nr	4	nr	100	0,3	1
19	<i>F. pedrosoi</i>	nr	32	>128	100	0,3	1
20	<i>F. pedrosoi</i>	nr	32	nr	100	$\leq 0,09$	0,5
21	<i>F. pedrosoi</i>	8	32	>128	100	3	0,5
22	<i>F. pedrosoi</i>	nr	32	nr	nr	12	0,5
23	<i>F. pedrosoi</i>	nr	>32	nr	nr	3	>32
24	<i>F. pedrosoi</i>	>64	16	>128	nr	6	>32
25	<i>F. pedrosoi</i>	nr	>32	nr	nr	>32	>32
26	<i>F. pedrosoi</i>	nr	>32	nr	nr	24	>32
27	<i>F. pedrosoi</i>	nr	>32	nr	nr	$\leq 0,09$	1
28	<i>F. pedrosoi</i>	>64	2	nr	100	12	>32
29	<i>F. pedrosoi</i>	nr	>32	nr	nr	12	>32
30	<i>F. pedrosoi</i>	nr	16	nr	nr	$\leq 0,09$	1
31	<i>F. pedrosoi</i>	nr	>32	nr	nr	$\leq 0,09$	0,5
32	<i>F. pedrosoi</i>	20	4	nr	100	$\leq 0,09$	$\leq 0,125$
33	<i>F. pedrosoi</i>	64	16	nr	100	$\leq 0,09$	0,5
34	<i>F. pedrosoi</i>	nr	>32	nr	nr	$\leq 0,09$	>32
35	<i>F. pedrosoi</i>	nr	>32	nr	nr	$\leq 0,09$	>32
36	<i>F. pedrosoi</i>	64	16	nr	nr	$\leq 0,09$	8
37	<i>F. pedrosoi</i>	nr	>32	nr	100	$\leq 0,09$	0,5
38	<i>F. pedrosoi</i>	32	8	nr	nr	$\leq 0,09$	0,5
39	<i>F. pedrosoi</i>	64	32	>128	nr	$\leq 0,09$	>32
41	<i>F. pedrosoi</i>	>64	>32	nr	nr	0,75	1
42	<i>F. pedrosoi</i>	nr	32	>128	nr	$\leq 0,09$	>32
43	<i>F. pedrosoi</i>	nr	>32	nr	nr	$\leq 0,09$	>32

*AnB: anfotericina B; Itra: itraconazol; Fluco: fluconazol; 5-FC: 5-fluorocitosina; Terb: terbinafina;

Ceto: cetoconazol

**nr: não realizado

Tabela 5 – Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de diversos antifúngicos frente as cepas de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas de amostras seriadas de pacientes com cromoblastomycose

Paciente n.º	Terapia vigente	Intervalo entre coletas	Cepa n.º	CIM (µg/ml)					CFM (µg/ml)						
				AnB*	Itra*	Fluco*	5-FC*	Terb*	Ceto*	AnB*	Itra*	Fluco*	5-FC*	Terb*	Ceto*
1	Itra+Crio**		28	4,1	0,35	>128	>100	0,18	0,25	>64	2	nr**	nr	12	>32
	Itra+Crio	4 meses	32	5,0	0,17	>128	100	≤0,09	0,25	20	4	nr	100	≤0,09	≤0,125
2	Itra		19	>64	1	64	100	0,12	0,5	nr	32	>128	100	0,3	1
	Itra	4 meses	27	>64	4	>128	>100	≤0,09	0,25	nr	>32	nr	nr	≤0,09	1
	Itra	4 meses	29	>64	4	>128	>100	≤0,09	0,25	nr	>32	nr	nr	12	>32
3	Itra		20	>64	0,3	>128	12,5	≤0,09	0,35	nr	32	nr	100	3	0,5
	Itra	1 mês	22	>64	5,7	>128	>100	≤0,09	0,35	nr	32	nr	nr	12	0,5
	Itra	7 meses	31	>64	4	>128	>100	≤0,09	0,25	nr	>32	nr	nr	≤0,09	0,5
4	Itra+Crio		26	>64	2,5	>128	>100	0,12	0,35	nr	>32	nr	nr	24	>32
	Itra+Crio	10 meses	41	32	5,6	>128	>100	0,10	0,5	>64	>32	nr	nr	≤0,09	1
5	sem tratamento		34	>64	2,0	>128	>100	≤0,09	0,5	nr	>32	nr	nr	≤0,09	>32
	Itra	20 dias	35	>64	1,4	>128	>100	≤0,09	0,25	nr	>32	nr	nr	≤0,09	>32
6	Itra		36	45	0,14	>128	>100	≤0,09	0,5	64	16	nr	nr	≤0,09	8
	Itra	20 dias	43	>64	5,6	>128	>100	≤0,09	2	nr	>32	nr	nr	≤0,09	>32

* AnB: anfotericina B; Itra: itraconazol; Fluco: fluconazol; 5-FC: 5-fluorocitosina; Terb: terbinafina; Ceto: cetoconazol; Crio: cricidurugia

**nr: não realizado

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de diversos antifúngicos frente a cepas de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas de pacientes com cromoblastomicose

Paciente n°.	Data de coleta	Cepa n°.	CIM (µg/ml)					CFM (µg/ml)						
			AnB*	Itra*	Fluco*	5-FC*	Terb*	Ceto*	AnB*	Itra*	Fluco*	5-FC*	Terb*	Ceto*
7	fev / 96	13	12,7	≤0,125	>128	62,9	2	0,25	64	<0,125	nr**	>100	>24	0,5
8	ago / 97	17	16	≤0,125	64	100	≤0,09	0,25	64	32	>128	100	0,18	0,5
9	jun / 96	18	>64	0,7	>128	100	≤0,09	0,35	nr	4	nr	100	0,3	1
10	ago / 97	21	4,6	0,35	64	12,5	0,6	0,25	8	32	>128	100	3	0,5
11	out / 97	23	>64	8	>128	>100	0,5	0,25	nr	>32	nr	nr	3	>32
12	set / 97	24	45	1	64	>100	24	0,25	>64	16	>128	nr	>24	>32
11	out / 97	25	>64	1,4	>128	>100	≤0,09	0,5	nr	>32	nr	nr	>32	>32
13	mai / 98	33	4	0,38	>128	50	≤0,09	0,25	64	16	nr	100	≤0,09	0,5
14	jul / 98	37	>64	4	>128	100	≤0,09	0,25	nr	>32	nr	nr	≤0,09	0,5
15	jul / 98	38	32	0,35	>128	>100	≤0,09	0,5	32	8	nr	nr	≤0,09	0,5
16	jul / 98	39	50,8	1	64	>100	≤0,09	0,25	64	32	>128	nr	≤0,09	>32
17	nov / 98	42	>64	0,7	>128	100	≤0,09	0,25	nr	4	nr	100	0,3	>32

* AnB: anfotericina B; Itra: itraconazol; Fluco: fluconazol; 5-FC: 5-fluorocitosina; Terb: terbinafina; Ceto: cetoconazol

**nr: não realizado

Tabela 7 - Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de diferentes antifúngicos frente às cepas obtidas de coleção

Nº	Fungos	Data de isolamento	Origem	CIM (µg/ml)					CFM (µg/ml)						
				AnB*	Ita*	Fluco*	5-FC*	Terb*	Ceto*	AnB*	Ita*	Fluco*	5-FC*	Terb*	Ceto*
1	<i>P. verrucosa</i>	fev/76	paciente	4	0,25	>128	12,5	0,18	≤0,125	64	16	nr***	>100	0,75	0,5
2	<i>C. canionii</i>	d**	d	8	0,3	>128	12,5	0,75	≤0,125	32	16	nr	>100	0,75	≤0,125
3	<i>P. verrucosa</i>	d	solo	>64	6,35	>128	>100	24	1	nr	>32	nr	nr	24	2
4	<i>F. pedrosoi</i>	ag/78	paciente	45,3	0,42	>128	>100	0,18	≤0,125	>64	32	nr	nr	0,3	0,5
5	<i>P. verrucosa</i>	d	d	10	≤0,125	>128	70,71	0,18	0,35	>64	32	nr	100	24	8
6	<i>R. aquaspersa</i>	d	d	>64	0,6	>128	>100	0,37	0,5	nr	32	nr	nr	24	>32
7	<i>P. verrucosa</i>	d	solo	>64	>32	>128	>100	2,12	8	nr	nr	nr	nr	>24	16
8	<i>F. compacta</i>	jun/62	paciente	22,68	0,6	>128	>100	0,12	0,35	>64	>32	nr	nr	12	2
9	<i>P. verrucosa</i>	mar/73	d	32	1	>128	3	1,46	1	>64	32	nr	25	24	2
10	<i>P. verrucosa</i>	fev/67	solo	12,7	5	>128	6	0,36	0,5	>64	32	nr	>100	1,5	2
11	<i>F. pedrosoi</i>	jun/93	paciente	16	0,63	>128	>100	24	0,25	64	2	nr	nr	24	0,5
12	<i>F. pedrosoi</i>	dez/95	paciente	0,8	≤0,125	>128	>100	24	≤0,125	64	32	nr	nr	24	0,5

* AnB: anfotericina B; Ita: itraconazol; Fluco: fluconazol; 5-FC: 5-fluorocitosina; Terb: terbinafina; Ceto: cetoconazol

**d: desconhecido

***nr: não realizado

Nota da BCQ: No impresso, não consta a página 70

Figura 3 - Curva de crescimento obtida para a cepa nº. 18 cultivada em ágar batata à 30°C

VII - DISCUSSÃO

Os resultados dos exames micológicos mostraram compatibilidade com os encontrados por outros autores que estudaram casos de cromoblastomicose. Assim, a observação de células muriformes ao exame direto é um achado comum em casos positivos da doença e a concomitante presença de hifas demácias é referida como possível^{64,96,138}. Essa referência pode ser devida à frequência relativamente baixa dessas estruturas no tecido hospedeiro, conforme comprovado neste estudo. Para alguns autores, porém, esse achado tem sido objeto de confusão, devido, provavelmente, à pouca experiência dos mesmos com essa infecção⁸³. Por outro lado, a importância das hifas assim como das células muriformes na patogenia da cromoblastomicose ainda é desconhecida.

Quanto às espécies isoladas, verificou-se compatibilidade com os resultados de autores que relatam elevada frequência de *Fonsecaea pedrosoi* em casos de cromoblastomicose, notadamente no Brasil^{2,24,123,157,160}.

Os agentes etiológicos dessa micose são pouco estudados. Diversas propriedades desses fungos ainda são desconhecidas, sendo raras as citações sobre o tempo de maturação das colônias. Esta característica pode representar um importante fator na padronização de testes de suscetibilidade, visto que variações nos resultados dos mesmos, podem estar diretamente relacionadas às condições do cultivo utilizado na preparação do inóculo¹⁴⁶. Verifica-se, porém, que entre os estudos de testes que incluem cepas de *F. pedrosoi*, o período de incubação das mesmas é bastante controverso, variando de 6 a 14 dias^{6,21,30}. Ainda neste contexto, observa-se que alguns autores preconizaram a utilização de suspensões contendo apenas conídios para testes com bolores^{44,45}. Em trabalhos mais recentes, a preparação dos inóculos tem sido preferentemente realizada com mistura dos diferentes tipos celulares, obtendo-se, nessas condições, resultados considerados adequados^{6,98,99,100}. De qualquer modo, porém, a existência de correlação entre os achados *in vitro* e a resposta clínica ainda é objeto de estudo^{56,59}.

A fim de se estabelecer o período mais adequado de desenvolvimento dos fungos isolados dos pacientes, para inclusão nos testes de suscetibilidade, tornou-se necessário estudar ao menos a curva de crescimento dos agentes em questão. Com base nos resultados obtidos a partir dessa curva, assim como, das observações micromorfológicas, realizadas em concomitância com a mesma, selecionou-se para preparação do inóculo células com 14 dias de crescimento. Nesse período, observou-se adequada proporção entre o número de células vegetativas e o de germinativas. Estudo realizado com *Cladophialophora carrionii*, foi compatível com as observações micromorfológicas do presente trabalho. No entanto, a fase logarítmica foi determinada entre o 4^o e o 8^o dias de crescimento que, segundo esses autores, é o período ideal para realização de testes de suscetibilidade e produção de antígenos¹⁴⁶. Nesta recomendação não foi considerado que, o tipo celular mais encontrado nessa fase de crescimento, conídios jovens, os quais não estão presentes na lesão, assim como, não são a única forma representativa do fungo em questão. Além disso, os autores utilizaram técnica diferente (peso seco) e uma única cepa, que pode não refletir o comportamento de todos os fungos desta espécie.

A maioria dos estudos de testes de suscetibilidade com fungos demácios foi realizado pela técnica de diluição em caldo ^{6,30,26,98,99,100,129}. Entretanto, diversas modificações têm sido preconizadas, a fim de adaptá-la aos trabalhos com os fungos em questão. A adoção de procedimentos que variam de autor para autor é explicada pela inexistência de técnica padrão, mundialmente aceita, e passível de aplicação em rotina laboratorial. A técnica clássica, ou seja, a de macrodiluição em caldo, é considerada trabalhosa, não permite execução do teste com mais de uma cepa e, assim como a de microdiluição, é de leitura difícil¹³³. Por outro lado, a técnica de diluição em ágar, regularmente utilizada por alguns autores^{154,162,163,178}, mostra certas vantagens sobre a anterior. Entre estas, incluem-se a possibilidade de execução do teste com um número proporcionalmente maior de cepas e melhor visualização das respostas celulares para leitura do

ponto final. Além disso, permite melhor aeração para crescimento fúngico, com menor risco de acúmulo de metabólitos que poderiam interferir com os resultados do teste^{144,151}. Em vista dessas vantagens, optou-se pela adoção da técnica de diluição em ágar para a execução deste trabalho.

Quanto a temperatura de incubação do teste, a escolha recaiu sobre 30°C, visto que esta tem sido consensualmente recomendada para o isolamento dos fungos, assim como, para as provas de suscetibilidade com os mesmos^{30,144}. Temperaturas inferiores poderiam retardar o desenvolvimento, já considerado lento, dos agentes em estudo, enquanto temperaturas superiores, por tempo prolongado, trariam riscos de degradação das drogas.

O meio eleito para realização dos testes, o yeast nitrogen base tamponado com fosfato tem composição química conhecida. Contém nutrientes que não interferem com a atividade dos antifúngicos, mas proporcionam adequado desenvolvimento dos fungos¹⁵³.

As pesquisas realizadas para a padronização do inóculo, demonstraram que a concentração do mesmo não alterava, na maioria dos casos, os resultados das concentrações inibitórias mínimas da anfotericina B. Este achado é compatível com descrições de estudos de testes de suscetibilidade com leveduras, mas é discordante das observações realizadas por pesquisadores em estudos com alguns fungos filamentosos^{44,133}.

Os resultados que indicam influência da concentração do inóculo na atividade da droga, mostram que estudos mais amplos devem ser realizados com esses fungos. Variações morfológicas são claramente observadas em *F. pedrosoi*, destacando-se a ocorrência de uma grande variedade de corpos de frutificação⁷⁷. Segundo alguns autores, o conteúdo em ergosterol encontrado em células vegetativas é proporcionalmente maior ao observado nas germinativas¹⁶¹. Visto que esse componente celular é a substância alvo da anfotericina B, o tipo de célula predominante no inóculo, ou formada em maior ou menor proporção durante a execução dos testes, pode explicar diferenças nos valores da concentração inibitória mínima do poliênico. De

qualquer modo, porém, adotou-se no presente trabalho a utilização de suspensão menos concentrada, considerando-se o relato de alguns autores que observaram melhor reprodutibilidade dos testes de suscetibilidade com esse tipo de inóculo¹³³.

O teste foi finalmente validado, a partir dos resultados obtidos para a cepa padrão. Esses dados foram compatíveis com os relatados por outros autores para a mesma cepa, ainda que a técnica empregada tenha sido diferente da adotada neste trabalho^{120,132}.

Considerando-se as respostas dos fungos em estudo às diferentes drogas incluídas no teste, chama a atenção a elevada frequência daqueles resistentes à anfotericina B. Este poliênico, embora utilizado há cerca de 40 anos, é relatado como a droga de primeira escolha na maioria das micoses graves. Isto se deve não só ao melhor conhecimento sobre os efeitos da mesma, mas também ao pequeno número de casos de resistência comprovados. Segundo Ingroff⁴³, 24 casos de resistência a anfotericina B (primária ou secundária) foram documentados no período de 1979 a 1996, e vários destes eram de pacientes com o sistema imunológico debilitado. Entre os fungos filamentosos, algumas espécies de *Aspergillus* desenvolveram resistência durante o tratamento, pois os primeiros isolados foram inibidos com CIMs menores que 1 µg/ml, o que não ocorreu com isolados posteriores. Em contraste, *Scedosporium apiospermum* parece ter resistência intrínseca ao poliênico¹⁶; os testes *in vitro* demonstram valores de CIMs acima de 2 µg/ml e, devido ao mesmo comportamento, alguns agentes de cromoblastomicose e feo-hifomicose com CIMs ≥ 4 µg/ml, também devem ser considerados resistentes, segundo alguns autores¹⁷². Assim, os resultados obtidos permitem referir que cepas de *F. pedrosoi* podem apresentar reduzida sensibilidade à anfotericina B, ou seja, podem ser resistentes a concentrações séricas desse antifúngico, quando empregado nas doses usualmente administradas por via endovenosa. Por outro lado, a resposta de algumas cepas às concentrações da droga superiores às encontradas no soro, podem clinicamente significar que a aplicação tópica do poliênico seria em alguns casos eficaz. Mesmo que existam indicações sobre a aplicação

de anfotericina B intralesionalmente³¹, poucos foram os relatos de sucesso terapêutico.

De qualquer modo, a ausência ou a pequena sensibilidade à anfotericina B, observada neste trabalho, tornam interessantes os estudos relacionados aos mecanismos que regem esse comportamento. Embora alguns autores tenham observado a ocorrência de ergosterol tanto nas hifas quanto nos conídios de uma cepa de *F. pedrosoi*⁵⁷, outros pesquisadores comprovaram a ausência do mesmo nas células conidiais de outra cepa dessa espécie¹⁶¹. A contradição evidenciada entre esses trabalhos pode ser devida a diferentes fatores, como a realização de análises em diferentes fases do desenvolvimento conidial. Em células mais jovens, o conteúdo em ergosterol pode ser insuficiente para ser detectado pelas técnicas empregadas nesses estudos. Por outro lado, não é mencionado, em qualquer dos trabalhos, a proporção entre o referido esterol e outros constituintes da membrana fúngica. O conhecimento desse fator é importante quando se considera o mecanismo de ação da anfotericina B. Segundo Vanden Bossche e colaboradores¹⁷², cepas de *C. tropicalis* resistentes ao tratamento com anfotericina B e que apresentaram valores de CIMs de 100µg/ml a 500µg/ml, eram deficientes em ergosterol. Baixos teores de ergosterol, podem explicar a resistência ou a pequena resposta de determinados fungos ao poliênico⁹. É interessante observar também que as maiores CIMs para anfotericina B, em nosso trabalho, foram das cepas dos pacientes em tratamento com itraconazol, nesses casos além da resistência inata à anfotericina B, outro mecanismo envolvendo provavelmente a síntese de ergosterol poderia estar conferindo resistência a estas cepas.

Outro fator que também pode estar envolvido na resistência de *F. pedrosoi* ao poliênico é a melanina, encontrada na parede e principalmente no melanossoma citoplasmático desse fungo³. Esse pigmento é um antioxidante natural, que protege as células fúngicas da ação das espécies reativas de oxigênio, geradas pelos polimorfonucleares^{51,70,71,175}. Se essa proteção for extensiva à atividade oxidante da anfotericina B, que contribui para a falência celular, pode-se também entender o comportamento

observado entre as cepas incluídas no presente trabalho, o qual foi compatível com os achados de alguns autores que detectaram resistência ou altos valores de CIMs em seus testes^{6,30}. Outros pesquisadores, porém, relatam valores de CIMs muito abaixo dos encontrados no presente estudo⁹⁶. Essas divergências podem estar relacionadas com as diferentes metodologias empregadas nos ensaios, bem como, com as diferenças em componentes celulares que podem variar de cepa para cepa. Em alguns desses estudos as amostras utilizadas eram de coleções⁹⁶ e poderiam estar em repouso durante anos. Em nosso estudo, observamos que, as cepas com menores CIMs para anfotericina B, encontravam-se anteriormente em coleções. A comprovação dos referidos eventos, também se torna importante quando se considera não só a resistência inata, reconhecida em algumas espécies para determinados antifúngicos, como também os relatos de ausência de sucesso em tratamentos de cromoblastomicose com anfotericina B^{96,175}.

Além dos fatores discutidos, alterações de caráter genético que podem conferir tanto resistência intrínseca como adquirida estão sendo investigadas. Alguns desses estudos têm mostrado que os principais genes (ERG2 e ERG3) envolvidos são os que expressam enzimas que atuam na biossíntese do ergosterol⁴³. Este mecanismo de resistência está melhor caracterizado em estudos com azóis¹⁷⁶.

Os valores obtidos para as CIMs do itraconazol foram similares aos observados por outros pesquisadores^{6,96}, mesmo utilizando a técnica de diluição em ágar ou diluição em caldo, com variações de metodologia em quase todos os trabalhos. No entanto, como os parâmetros adotados em diversos estudos para definir as cepas como sensíveis ou resistentes a esse azol são muito diferentes, as comparações entre os achados qualitativos tornam-se difíceis. Alguns pesquisadores²¹ consideram que valores de CIMs $\geq 1,0\mu\text{g/ml}$ caracterizam respostas de cepas resistentes, para outros, porém, essas cepas determinam valores $\geq 10,0\mu\text{g/ml}$ ⁶. Segundo Odds¹¹⁴, não existem padrões definidos para diferenciar sensibilidade de resistência. Em artigo de revisão, esse autor e colaboradores, consideraram como

resistentes as cepas que apresentaram reduzida sensibilidade quando comparada a outras de uma mesma espécie, avaliadas pela mesma técnica em um mesmo laboratório. Esse conceito também poderia ser aplicada no presente estudo, além da definição de suscetibilidade com base no nível sérico.

De acordo com os padrões estabelecidos neste trabalho, cerca de 77% das amostras estudadas não responderam ao itraconazol. Esse valor pode parecer elevado, quando se considera que são raros os relatos de resistência a esse azol. Em artigo de revisão, Ingroff⁴³ relata casos de resistência de leveduras ao itraconazol em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida que fizeram uso de fluconazol e não responderam a terapia. Nesses casos, além da falha terapêutica foi também observado aumento de CIMs dos isolados posteriores em relação aos primeiros isolados, mas o nível plasmático da droga não foi avaliado. Por isso, em pacientes que não repondem a terapêutica, o nível plasmático deve ser monitorado, pois pode estar ocorrendo problemas com a absorção da droga⁴³. Segundo a mesma autora, leveduras com CIMs de itraconazol de 0,5µg/ml e $\geq 1,0\mu\text{g/ml}$ foram relacionados com falha no tratamento em 8 pacientes tratados com 200mg e 600mg, respectivamente, desse azol⁴³. Assim como para leveduras, são raros os relatos de resistência ao itraconazol em fungos filamentosos. A literatura carece de estudos sobre a correlação de resistência *in vitro* e *in vivo*. Alguns destes estudos foram conduzidos por autores ingleses, que verificaram compatibilidade entre falha terapêutica em infecção por *Aspergillus fumigatus* e os testes de suscetibilidade. Esses autores consideraram que nesse caso, o mecanismo de resistência proposto estava relacionado a mutação da enzima alvo 14 α - demetilase³⁵.

Em nosso estudo, verificamos que, ao menos entre os 14 isolados de amostras seriadas (tabela 5), um possuía resistência intrínseca e dois podem tê-la adquirido durante o tratamento com itraconazol. Estudos que demonstrem resistência a essa droga em cepas seqüenciais de agentes de cromoblastomicose não foram encontrados na literatura pesquisada, mas os

dados obtidos podem refletir os resultados de terapia prolongada com o itraconazol. Frente a esses achados, torna-se necessário um estudo mais amplo sobre o tema em questão e os mecanismos envolvidos nesses processos. De modo geral, os mecanismos moleculares de resistência propostos para os azóis são: alteração no importe de drogas, alteração no processamento intracelular da droga (modificação ou degradação), alteração na enzima alvo (pontos de mutação, super-expressão genética, amplificação genética, conversão genética ou recombinação mitótica), alterações em outras enzimas da via de biossíntese do ergosterol, alterações na bomba de efluxo ("*ABC transports e major facilitators*")¹⁷⁶. No entanto, esses fatores são propostos para e estudados em leveduras, e pouco se conhece sobre os mecanismos que podem estar envolvidos em fungos filamentosos. Esses conhecimentos são de extrema importância, pois o itraconazol vem sendo apontado como a droga de escolha no tratamento de diversas micoses causadas por fungos filamentosos, incluindo os agentes da cromoblastomicose^{41,124,134,135}.

Para alguns autores, a aplicação do itraconazol em pacientes com cromoblastomicose não resultou em melhora clínica^{15,131}. Esse insucesso também foi observado para 2 pacientes incluídos no presente trabalho; mas houve regressão do processo clínico em outros pacientes.

Nos poucos relatos de resistência ao itraconazol, a maioria das cepas também apresentou resistência ao cetoconazol e/ou ao fluconazol, o que sugere resistência cruzada^{43,171}. Em nosso estudo, este fato também foi observado com as cepas sequenciais de dois pacientes. Para um desses pacientes (2) essa resistência foi evidenciada entre o itraconazol e o fluconazol. Para outro paciente (6) os resultados obtidos indicam resistência cruzada entre a anfotericina B e o cetoconazol. Alterações na síntese do ergosterol parecem ter ocorrido nos isolados posteriores, principalmente nas amostras recuperadas do paciente 6. Nos outros casos de aumento de CIMs, para itraconazol nas amostras sequenciais, não foi observado resistência cruzada com nenhuma outra droga. O que indica que a resistência detectada nestes casos para o itraconazol é específica. No

entanto, para podermos afirmar que as cepas adquiriram resistência a droga, específica ou cruzada, são necessários estudos moleculares para comprovar que se trata da mesma cepa e quais são os mecanismos envolvidos neste processo.

Os dados obtidos neste trabalho, demonstram resistência de todas as cepas ao fluconazol e são compatíveis com os descritos na literatura para este mesmo grupo de fungos⁶. No entanto, alguns autores relatam⁵⁵ que CIMs elevadas para o fluconazol apresentam pouca correlação com resultados *in vivo*, quando comparado com o itraconazol⁵⁶. Em testes com *Histoplasma capsulatum*, o cetoconazol foi muito mais efetivo *in vitro* do que o fluconazol, mas, este foi mais eficaz no tratamento em modelo experimental onde foi utilizada a mesma cepa. Apesar de ser droga de eleição em algumas infecções causadas por leveduras, a aplicação do fluconazol no tratamento de micoses causadas por fungos dimórficos e filamentosos é discutível. No tratamento da esporotricose, blastomicose e coccidioidomicose, é indicada como terapia alternativa^{7,135}, mas não é indicada no tratamento de histoplasmose, principalmente nos casos graves¹⁰³. Já foi descrito o surgimento de cepas de *H. capsulatum* que adquiriram resistência durante a terapia prolongada com o fluconazol em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida¹⁷⁴. O principal mecanismo de resistência proposto foi considerado como redução da sensibilidade de componentes da síntese de ergosterol frente ao antifúngico em questão. Nesse estudo não foi observada resistência cruzada com o itraconazol, droga mais ativa nos testes *in vitro*. Embora o fluconazol e o itraconazol exerçam atividade antifúngica atuando sobre a lanosterol 14 α -demetilase, uma enzima importante na biossíntese do ergosterol em leveduras, apenas o itraconazol também atua sobre outra enzima responsável por essa reação nos bolores^{98,171}. Isso pode explicar a maior atividade do itraconazol tanto em ensaios *in vivo* como *in vitro*. Apesar da elevada afinidade do fluconazol pela lanosterol 14 α -demetilase, o uso prolongado da droga no tratamento de infecções causadas por leveduras também pode levar ao surgimento de cepas resistentes. Esse fato foi

comprovado por diversos autores principalmente em pacientes imunodeprimidos^{43,53,171}. Em alguns desses casos as cepas desenvolveram múltiplos mecanismos de resistência⁵³.

Apesar de alguns autores terem alcançado resposta terapêutica com o fluconazol em casos de cromoblastomicose¹⁸⁰, os mecanismos que regem a falha terapêutica na maioria dos casos e a resistência detectada *in vitro*, ainda são desconhecidos. Muitos dos mecanismos descritos anteriormente para outros fungos, poderiam estar também envolvidos.

Poucos são os casos de resistência descritos para o cetoconazol, tanto *in vivo* como *in vitro*. Em nosso trabalho, a resistência dos agentes da cromoblastomicose a esse antifúngico também não foi detectada. Os valores das CIMs foram semelhantes aos obtidos por outros autores que estudaram esse grupo de fungos^{30,47}. O uso do cetoconazol em micoses subcutâneas é raro, devido a necessidade de tratamento prolongado para essas infecções, o que pode levar o paciente a sofrer os efeitos colaterais da droga. O cetoconazol é muito empregado no tratamento de candidíases e sua grande vantagem é a administração por via oral¹³⁵. Alguns pesquisadores já utilizaram a droga no tratamento da cromoblastomicose, tendo sido observada melhora clínica para a maioria dos casos^{58,95,107}. No entanto, os relatos de cura são raros. Ensaio *in vitro* com o cetoconazol em associação com a 5-fluorocitosina demonstraram sinergismo, com redução das concentrações das drogas abaixo do nível sérico³⁰. Essa associação poderia ser uma alternativa no tratamento da cromoblastomicose em alguns pacientes, desde que o agente causador fosse comprovadamente sensível a essa associação de drogas.

Assim como observado neste trabalho, alguns pesquisadores não obtiveram correlação entre baixos valores de CIMs com sucesso terapêutico. Em estudo com leveduras isoladas de pacientes com candidíase vaginal recorrente, não foi detectada nenhuma amostra resistente aos azóis. Segundo esses autores, fatores relacionados a interação hospedeiro-parasita podem estar envolvidos na falha terapêutica⁹². Outra micose tratada com o cetoconazol, mas com bons resultados, é a

paracoccidioidomicose^{7,42,135}. Apesar da necessidade de longo período de tratamento, poucos são os pacientes que apresentam efeitos colaterais. Nesse caso, também outros fatores relacionados ao fungo poderiam estar envolvidos na resposta terapêutica, pois outras drogas com espectro de ação maior que o do cetoconazol são menos eficazes no tratamento desta infecção.

O alto grau de resistência *in vitro* observado para a 5-fluorocitosina, também foi descrito em outros estudos^{6,30}. O uso isolado dessa droga não é recomendado, visto que o desenvolvimento de resistência em vários grupos de fungos tem sido freqüentemente observado^{7,88}. Resistência intrínseca ou adquirida a 5-fluorocitosina é resultante, na maioria das vezes, de um defeito na citosina desaminase, enzima que desamina a droga originando a 5-fluoracil^{7,40}. Este potente antimetabólito é, em alguns fungos, mais eficaz do que a própria 5-fluorocitosina. Este fato também foi observado para fungos demácios, incluindo agentes da cromoblastomicose. Polack¹²¹ demonstrou em estudos *in vitro* maior frequência de resistência desses agentes a 5-fluorocitosina do que a 5-fluoracil. Com base nesses dados, o desenvolvimento de resistência secundária a 5-fluorocitosina durante o longo tempo de tratamento na cromoblastomicose poderia ser facilmente explicada. Especialmente para cepas de uma mesma espécie com alta frequência de resistência, pois estas já estariam resistentes antes da atuação do antimetabólito. Além desse mecanismo de resistência, outros poderiam estar envolvidos, como os observados em leveduras e *Aspergillus* spp. Para estes fungos, verificou-se a ocorrência de mutações em várias enzimas independentes, algumas das quais são importantes para a ação da 5-fluorocitosina¹²¹.

Diversos estudos têm demonstrado que a 5-fluorocitosina associada à anfotericina B, leva a ação sinérgica *in vitro* e *in vivo*^{7,40,127}. A alteração promovida pelo poliênico na membrana celular, facilita a penetração e, portanto, a atividade da 5-fluorocitosina sobre o RNA e o DNA fúngico⁹¹. Essa associação foi durante muito tempo o de escolha para o tratamento da cromoblastomicose, após a introdução do itraconazol, foi praticamente

abandonado, principalmente no Brasil, onde a 5-fluorocitosina não é mais comercializada.

A sensibilidade à atividade inibitória da terbinafina pôde ser observada na maioria das amostras estudadas, confirmando achado de outros autores⁹⁹. Ressaltam-se, porém, os dados obtidos para as CFMs frente a maioria das cepas. A sensibilidade das mesmas à ação fungicida da droga, estimula a execução de estudos mais amplos sobre a aplicação da terbinafina em casos de cromoblastomicose. Esse parecer é melhor entendido quando se considera que esse antifúngico é tido como um importante agente para o tratamento de dermatofitoses de pele e unha³⁵. Alguns autores também obtiveram sucesso no tratamento da cromoblastomicose causada por *F. pedrosoi* ou por *C. carrionii* com terbinafina^{49,50}. O mecanismo fungicida proposto para a terbinafina é baseado no acúmulo de altos níveis de esqualeno intracelular, provavelmente em combinação com a deficiência em ergosterol resultante da inibição da esqualeno epoxidase¹⁴³. Em fungos que requerem somente inibição parcial da síntese do ergosterol para inibição do crescimento, observou-se que também estão sujeitos à ação fungicida da terbinafina. Este fato sugere que a deficiência do ergosterol não é a causa primária da morte celular⁶⁶. Outro fator a ser considerado é que os compostos azólicos também inibem a síntese do ergosterol, mas sua ação primária é fungistática⁶⁶. Portanto, o acúmulo de esqualeno seria o reflexo da atividade das alilaminas. Isto pode ser observado em fungos tratados com terbinafina que mostraram altas concentrações de esqualeno, sofrendo pequena redução no conteúdo de ergosterol⁶⁶. Além dessas considerações, Ryder⁶⁶ sugere que diferenças morfológicas também influenciam nos valores das CIMs. Segundo este autor os fungos filamentosos seriam intrinsicamente mais sensíveis à terbinafina do que as leveduras⁶⁶. Infelizmente, assim como para as demais drogas descritas neste trabalho, essas ocorrências não foram ainda estudadas em fungos causadores de cromoblastomicose. Acreditamos, porém, que esses mecanismos também possam estar envolvidos nestes agentes.

Outro dado importante é a diferença entre as CIMs e CFMs das cepas isoladas de pacientes frente as de coleção de cultura. As últimas mostraram-se mais resistentes à terbinafina. Muitos estudos são realizados com amostras de coleção, podendo, desta forma, não refletir o verdadeiro perfil de suscetibilidade de uma determinada espécie frente a determinado antifúngico. Apesar desses achados, até o momento não foi descrito nenhum caso comprovado de resistência a terbinafina. Os resultados obtidos para dermatófitos isolados de pacientes que não responderam à terapia com esse antifúngico, não revelaram qualquer diferença dos encontrados para as amostras de pacientes que responderam ao tratamento⁶⁶. Nesses casos, assim como para qualquer outra droga, outros fatores podem estar relacionados com a falha terapêutica, tais como: fatores do hospedeiro (defeito na resposta imune, focos latentes de infecção) e fatores farmacocinéticos (dosagem, penetração, absorção, ligação a proteína, interação com outras drogas, entre outros).

Em geral, os diferentes estudos *in vitro* indicam que algumas cepas respondem melhor a determinados antifúngicos do que outros. Assim, é evidente a necessidade de testes laboratoriais padronizados para auxiliar a clínica na escolha da medicação adequada. Por outro lado, muitos pesquisadores acreditam que a associação de drogas seja a terapia do futuro^{28,29}. Essa associação pode evitar o surgimento de cepas resistentes a uma determinada droga, além de reduzir os efeitos colaterais de cada uma delas. Esta opinião também é compartilhada por nós, e consideramos que os testes de suscetibilidade *in vitro* possam ser de grande auxílio na escolha da melhor associação das drogas em determinados casos.

VIII - CONCLUSÕES

Quanto a padronização:

- As condições ótimas para execução do teste de suscetibilidade, para os agentes da cromoblastomicose, pela técnica de diluição em ágar foram: meio YNBP, cepas com 14 dias de crescimento, inóculo com cerca de 4×10^4 células/ml, incubação a 30°C e leitura entre o 3º e o 7º dia de incubação.

Quanto aos perfis de suscetibilidade:

- Apenas uma cepa foi sensível no teste de CIM para a anfotericina B. Todas as cepas foram resistentes a anfotericina B no teste de CFM.
- Os maiores valores de CIMs encontravam-se entre as cepas de pacientes que estavam em tratamento com itraconazol. Os menores valores de CIMs foram observados entre as cepas oriundas de coleções.
- A resistência ao itraconazol foi detectada em 77% das cepas analisadas no teste de CIM e apenas uma cepa foi sensível no teste de CFM.
- Nas amostras seriadas provenientes de pacientes, observou-se que em 2 casos as cepas mantiveram-se resistentes, mas com aumento nos valores de CIMs para itraconazol. Em outros dois casos, onde os primeiros isolados eram sensíveis, os posteriores apresentaram resistência para um desses casos, observou-se também resistência cruzada com a anfotericina B e aumento de CIM do segundo isolado para o cetoconazol.
- Todas as 39 cepas foram resistentes ao fluconazol, nos testes de CIM e CFM. Em um caso foi observada resistência cruzada com o itraconazol.
- Para o cetoconazol, todas as cepas foram sensíveis nos testes de CIM, mas 13 foram resistentes nos testes de CFM.
- Das 39 amostras, apenas 7 foram sensíveis à 5-fluorocitosina, nos testes de CIM e somente uma o foi no teste de CFM.
- A sensibilidade das cepas em estudo foi maior para o cetoconazol, seguido da terbinafina; 34 cepas responderam a atividade inibitória e 22 a letal. Os maiores valores de CIM e CFM da terbinafina foram obtidos com cepas de coleções.
- O perfil de suscetibilidade das cepas variou de acordo com o grupo estudado (sequenciais, não sequenciais e coleção).

- Em dois casos do grupo sequencial, a correlação clínica foi estabelecida, pois os pacientes não responderam a terapêutica com o itraconazol e as cepas isoladas foram resistentes *in vitro*.

Frente a estas considerações, estudos mais amplos tomam-se necessários para o entendimento dos mecanismos envolvidos na resistência dos agentes da cromoblastomicose a maioria dos antifúngicos incluídos neste trabalho.

IX - RESUMO

Andrade, T. S. Suscetibilidade *in vitro* de agentes causadores de cromoblastomicose frente a diferentes antifúngicos. São Paulo, 1999. 121p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Diversos recursos terapêuticos são utilizados para controle ou cura da cromoblastomicose, mas ainda não existe terapia padrão. Poucos são os estudos relacionados à resposta dos fungos causadores frente a antifúngicos atualmente disponíveis. Nosso objetivo foi determinar os perfis de suscetibilidade desses agentes aos diferentes antifúngicos utilizados no tratamento das micoses, através da padronização da técnica de diluição em ágar e correlacionar com o tratamento vigente para alguns pacientes. Foram estudadas 39 cepas de agentes de cromoblastomicose, sendo, 12 de coleções; 30 foram identificadas como *Fonsecaea pedrosoi*, 6 como *Phialophora verrucosa* e cada uma das outras como: *Cladophialophora* (*Cladosporium*) *carrionii*, *Fonsecaea compacta* e *Rhinocladiella aquaspersa*. Foram realizados estudos preliminares para escolha das melhores condições para os testes de suscetibilidade. O meio selecionado foi o yeast nitrogen base tamponado com fosfato (YNBP). O inóculo contendo cerca de 4×10^4 células/ml foi preparado a partir de cepas com 14 dias de desenvolvimento. A incubação foi realizada a 30°C e a leitura ocorreu do 3º ao 7º dias de incubação. Os testes foram realizados com: anfotericina B nas concentrações de 0,25µg/ml a 64µg/ml, 5-fluorocitosina de 0,3µg/ml a 100µg/ml, fluconazol de 0,25µg/ml a 128µg/ml, terbinafina de 0,09µg/ml a 24µg/ml, itraconazol e cetoconazol de 0,125µg/ml a 32µg/ml. Para auxiliar na interpretação dos resultados, o estabelecimento de sensibilidade ou resistência foi baseado nos níveis séricos alcançados pelas drogas. Apenas uma cepa foi sensível no teste de CIM a anfotericina B. Os valores mais altos para anfotericina B estavam entre os pacientes que fazem uso de itraconazol. Entre as 39 cepas estudadas, 77% foram resistentes ao itraconazol no teste de CIM. Para as cepas de 4 pacientes isoladas de amostras seriadas houve aumento das CIMs e para dois deles não houve

melhora clínica com itraconazol. Em um desses casos houve resistência cruzada com fluconazol e outro com cetoconazol e anfotericina B. Todas as cepas foram sensíveis ao cetoconazol, mas resistentes ao fluconazol nos testes de CIM e CFM. Apenas 7 cepas responderam a 5-fluorocitosina no teste de CIM. O cetoconazol foi a droga mais eficaz, seguido da terbinafina, apesar de algumas cepas apresentaram resistência a mesma, principalmente nas procedentes de coleções. Os dados obtidos sugerem resistência inata dos fungos em estudos a algumas drogas e adquirida para algumas cepas de pacientes em tratamento com itraconazol. Esses mecanismos devem ser melhor pesquisados, além da eficácia associação de drogas, ou outra terapia e do melhor desempenho da terbinafina nos testes.

SUMMARY

Andrade, T. S. SUSCEPTIBILITY "IN VITRO" OF AGENTS OF THE CHROMOBLASTOMYCOSIS AGAINST DIFFERS ANTIFUNGALS. São Paulo, 1999. 121p. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Several therapeutics resources are used to control or cure of chromoblastomycosis, but there is not stand therapy yet. Feel are the studies related with fungi agents against actual antifungals. The aim of this study was to determine susceptibility profiles this fungi against differs antifungals used in treatment of mycosis, through the standaring agar diluition thecnica and relation with treatment to some pacients. 39 strains of agents were studied of chromoblastomycosis, 12 were collections, 30 were identified as *F. pedrosoi*, 6 as *P. verrucosa* and each one of others as: *C. carrionii*, *F. compacta* and *R. aquaspersa*. Previous studies were performed to choose the best conditions for susceptibilities tests. The culture medium selected was yeast nitrogen base buffering with phosphate (YNBP). The inoculum about 4×10^4 cels/ml. Was performed with strains with 14 days of developement. The incubation was performed of 30°C and the reading occurred from the 3^o to the 7^o days of incubation. The tests were performed with amphotericin B in concentration of 0,25µg/ml to 64µg/ml, 5-flucytosin from 0,3µg/ml to 100µg/ml, fluconazole from 0,25µg/ml to 128µg/ml, terbinafine from 0,09µg/ml to 24µg/ml, itraconazole and ketoconazole from 0,125µg/ml to 32µg/ml. The interpretation of results was based in the plasma levels reached by the drugs. Only one strain was susceptible in the test of MIC for amphotericin B. The values highest for AmB were among the patients who used itraconazole. Among the 39 strains studied, 77% were resistent to the itraconazole in the test of MIC. For the strains there was increase of the MICs for the strains of four patients recovered from sequential samples and for to of them was not improvement with itraconazole. At one of these cases there was cross resistance with fluconazole and other with ketoconazole and amphotericin B. All the strains were susceptibles to

ketoconazole, but resistant to the fluconazole in the MIC's and MFC's tests. Only 7 strains were sensitive to 5-FC in the MIC test. The terbinafine was the best drug, despite of some strains showed resistance, mainly in the culture collection. The results suggest intrinsic resistance of the fungi in study to some drugs and acquired resistance for some strains of the patients in treatment with itraconazole. These mechanism must be more researched efficacy association of drugs, or other therapy and of the best fulfillment of the terbinafine in the tests.

X - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AJELLO, L.; GEORG, L. K. A case of phaeohyphomycosis caused by a new species of *Phialophora*. *Mycologia*, Harlowe.v. 66, p. 490-498, 1974.
2. AL - DOORY, Y. *Chromomycosis*. Missoula: Mountain Press, 1972, 203p.
3. ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S.R.; SOUZA, R.W.; ANGLUSTER, J.; TRAVASSOS, L. R. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *J. Gen. Microbiol.*, Colchester. V.137, p. 837-844, 1991.
4. ARANGO, M.; JARAMILO, C.; CORTÉS, A.; RESTREPO, A. Auricular chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella aquaspersa*. *Med. Mycol.*, Plymouth. V.36, p. 43-45, 1998.
5. BARBA-GÓMEZ, J. F.; MAYORGA, J.; MCGINNIS, M.R.; GONZÁLES-MENDOZA, A. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *J. Am. Acad. Dermatol.* St. Louis. V.26, p.367-70. 1992.
6. 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.
7. BENNETT, J. E. Fármacos antimicrobianos. In: Handerman, J. G.; Limberd, L. E.; Mollinorf, B. P.; Rudsson, R. W. Goodman, L. S. *Goodman and Gilman - as bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara - Koogan 1996, cap. 49, p. 864-875.
8. BENNETT, J. E. Antifungal agents. In: Mandell, G. L.; Bennett, J. E.; Dolin, R. *Principles and pratic of infectious diseases*. 4. ed. New York : Churchill Livingstone. 1995, cap.31, v1, p. 401-410.

9. BITTENCOURT, A. L.; LONDERO, A. T.; ANDRADE, J. F. Chromoblastomycose auricular. Relato de um caso. *Rev. Inst. Med. Trop.* São Paulo. v36, n.4, p. 381-83, 1994.
10. BONIFAZ, A.; MARTÍNEZ –SOTO, CARRASCO-GERARD, E.; PENICHE, J. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery, and combination of both. *Int. J. Dermatol.* Philadelphia. V.36, p.542-547, 1997.
11. BOPP, C. Tratamento da cromomicose pelo calciferol. Porto Alegre, Livraria do Globo, 1957. (Tese). Apud: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Cromomicose. In: *Micologia médica, fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8. ed. São Paulo: Savier., 1991. p. 376 - 386.
12. BOPP, C. Cura da cromoblastomycose por novo método de tratamento. *Med. Cut. I.L.A.* v. 4, p.285-292, 1976.
13. BOPP, C. New method for the treatment of chromoblastomycosis. In: FOURTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE MYCOSES. Brasília, 1978. *The Black and white yeasts*. Washington. Pan Am. Health Organ. Sci. Publ. n.356, p.33-34.
14. BORELLI, D. – *Acrotheca aquaspersa* nova species agente de cromomycosis. *Acta Cient. Venez.* v. 23, p.193-196, 1972.
15. BORELLI, D. A clinical trial of itraconazole in the treatment of deep mycoses and leishmaniasis. *Rev. Infect. Dis.* Chigago. v.9, supl.1, p. 57-63, 1987.

16. BRAJTBURG, J.; POWDERLY, W. G.; KOBAYASHI, G.; MEDOFF, G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob. Agents. Chem. Washington*. v. 34, p.183-188, 1990.

17. BRUMPT, E. Précis de Parasitologie. 3.ed. Paris, Masson, 1922, p. 1105. Apud: AL - DOORY, Y. *Chromomycosis*. Missoula: Mountain Press, 1972, 203p.

18. BRYGOO, E. R.; DESTOMBES, P. Épidémiologie de la chromoblastomycose humaine. *Bull. Inst. Pasteur.*, Paris. v.74, p. 219 - 243, 1976.

19. BURKS, J.B.; WAKABONGO, M.; MCGINNIS, M.R. Cromoblastomycosis. A fungal infection primarily observed in the lower extremity. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.*, v. 85, n.5, p. 260-264, 1995.

20. BUTTY, P.; LEBECQ, J.-C.; MALLIÉ M. & BASTIDE, J.-M. Evalution of susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: a new technique. *J. Med. Vet. Mycol. Dorchester*. v.33, p.403-409, 1995.

21. 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 e saperconazole. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. v.91, n.6, p. 779-784, 1996.

22. CARRIÓN, A.L., SILVA-HUTNER, M. Taxonomic criteria for the fungi of chromoblastomycosis with reference to *Fonsecaea pedrosoi*. *Int. J. Derm.* v.10, p.35-43, 1971. Apud: AL - DOORY, Y. *Chromomycosis*. Missoula: Mountain Press, 1972, 203p.

23. CASTRO, L. G. M. Chromomycosis: A therapeutic challenge. *Clin. Infect. Dis. Chigago*. v.15, p. 553-554, 1992
24. CASTRO, L. G. M. Tratamento da cromoblastomicose pela criocirurgia com nitrogênio líquido. São Paulo, 1998. 78p. (Tese de doutorado - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo).
25. CASTRO, R. M.; CASTRO, L. G. M. On the priority of Description of chromomycosis. *Mycosen*. Berlin. v.30, n. 9, p. 397-403, 1987.
26. CERMEÑO-VIVAS, J. R.; TORRES-RODRIGUES, J. M. Susceptibility test of dematiaceous fungi with broth macro and microdilution and ETEST. In: 13^o CONG. INT. SOC. HUM. MYCOL. - ISHAM, Parma, 1997. *Abstr.* p.203.
27. CESARO, S.; CALORE, E.; MESSINA, C.; ZANESCO, L. Allergic reaction tthe lipossomal component of lipossomal amphotericin B. *Support Care Cancer*. v.7, p.284-286, 1999.
28. CHANG, M.R., CURY, A.E. Amphotericin B-metronidazole combination against *Candida spp*. *Rev. Ibero. Micol*. Bilbao. v.15, p.78-80, 1998.
29. CLANCY, C.J., WINGARD, J.R., NGUYEN, M.H. Aproach to fungal infection with triple antifungal combination therapy: demonstration of *in vitro* synergy against *Exophiala jeanselmei*. In: 13^o CONG. INT. SOC. HUM. MYCOL. - ISHAM, Parma, 1997. *Abstr.* p.222.
30. CORRADO, M.L.; KRAMER, M.; CUMMINGS, M; ENG, R.H. Susceptibility of dematiaceous fungi to amphotericin B, miconazole, ketoconazole, flucytosine and rifampin alone and in combination. *Sabouraudia*. v.20, p. 109-113, 1982.

31. CUEVA-PAZ, S.A. Reporte de caso tratado com anfotericina B intralesional. *Dermatologia (Mex.)*, v.13, p.139-146, 1969. Apud: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Cromomicose. In: *Micologia médica, fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8. ed. São Paulo: Savier., 1991. p. 376 - 386.

32. CURY, A. E.; IONEDA, T.; MINAMI, P. S. - Studies on components of chloroform-methanol extract from *Madurella grisea*. *J. Med. Vet. Mycol.* Dorchester. v. 24, n.2, p. 161-164, 1986.

33. DAVEY, K. G.; SZKELY, A. JONHSON, E. M.; WARNOCK, D. W. Comparison of new commercial colorimetric microdilution method with a standart method for *in vitro* susceptibility testing of *Candida* spp. And *Cryptococcus neoformans*. *J. Antimicrob. Chemother.* London. v. 42, n.4, p. 439-444, 1998.

34. DE CLERCQ, D.; KAKIESSE, M.; DE VROEY, C.; MAZEBO, P. Traitement de la cromomycose par l'association 5-fluorocytosine et thiabendazole – A propos d'un cas zairois à *Fonsecaea pedrosoi*. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* v.65, p.95-97, 1985.

35. DENNING, D. W.; RADFORD, S. A.; OAKLEY, K. L.; JONHSON, E. M.; WARNOCK, D. W. Correlation between *in vitro* susceptibility testing to itraconazole and *in vivo* outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J. Antimicrob. Chemother.* London. v. 40, p. 401-414, 1997.

36. DIAZ, M.; NEGRONI, R.; MONTERO-GEI, F.; CASTRO, L.G. M.; SAMPAIO, S. A.; BORELLI, D.; RESTREPO, A.; FRANCO, L. BRAN, J. L.; ARATHOON, E. G.; et. al. A Pan - American 5-year study of fluconazol therapy for deep mycoses in the immunocompetent host. Pan - American Study Group. *Clin. Infect. Dis.* Chigago. v.14, supl.-1, p. 68-76, 1992.

37. DIXON, D. M.; POLAK-WYSS, A. - The medically important dematiaceous fungi and their identification. *Mycoses*, Berlin. v. 34, p. 1-18, 1991.
38. DOLLERY, C., ed. Therapeutic Drugs - Amphotericin B. London: Potter, Churchill livingstone . 1991. p. 113-116.
39. DOLLERY, C.,ed. Therapeutic Drugs – Fluconazole. London: Churchill livingstone - Supl I . 1992. p. 90-94.
40. DOLLERY, C., ed.Theraputic Drugs Flucytosine. London:Churchill livingstone. 1991. p. 44-46.
41. DOLLERY, C.ed. Therapeutic Drugs – Itraconazole. London: Churchill livingstone - Suplemento I. 1992. p.114-119
42. DOLLERY, C.,ed. Therapeutic Drugs – Ketoconazole. London: Churchill livingstone – v2- PT1 - 1991. p.21-24.
43. ESPINELL-INGROFF, A. Clinical relevance of antifungal resistance. *Infect. Dis. Clin. North Amer.* Washington. v. 11, p. 929-944, 1997. .
44. ESPINEL-INGROFF, A.; BARCHIESI, F.; HAZEN, K. C.; MARTINEZ-SUAREZ, J. V.; SCALISE, G. S. Standartization of Antifungal susceptibility testing and clinical relevance. In: PROCEEDINGS OF THE XIV CONGRESS INT. SOC. HUM. MYCOL. – ISHAM. Parma. 1997. *Medical Mycology*. Glasgow, Polonelli, L. O. and Walsh, T. J. 1998.v. 36, supl.1, p. 68-78.
45. ESPINEL-INGROFF, A.; DAWSON, K.; PFALLER, M. A.; ANAISSIE, E.; BRESLIN, B.; DIXON, D.; FOTHERGILL, A.; PAETZNICK, V.;

- PETER, J.; RINALDI, M.; WALSH, T. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* Washington. v. 39, p.314-319, 1995.
46. ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M. A. Antifungal Agents and Susceptibility testing,. In P. R. MURRAY, E. J. BARON, M. A. PFALLER, F. C. TENOVER AND R. H. YOKEN, *Manual of Clinical Microbiology*, 6. ed., Washington: American Society for Microbiology, ASM. Press ,1995. p.1405-1414.
 47. ESPINEL-INGROFF, A.; SHADOMY, S.; GEBHART, R. J. *In vitro* studies with R 51, 211 (itraconazole). *Antimicrob. Agents Chemother.* Washington. v.26, p.5-9, 1984.
 48. ESTERRE, P.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; RAMARCEL, E. R.; PECARRERE, J.-L. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 55, n.1, p. 45-47. 1996.
 49. ESTERRE, P.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; RAHARISOLO, C. Histoire naturelle des chromoblastomycoses à Madagascar et dans l'océan indien. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* Paris. v.90, p. 312-317, 1997.
 50. ESTERRE, P.; INZAN C. K.; RAMARCEL, E. R.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; RATSIOHARANA, M.; PECARRERE, J.-L.; ROIG, P. Treatment of chromomycosis with terbinafine: preliminary results of an open pilot study. *Br. J. Dermatol.*, Oxford. v. 134, supl.46, p. 33-36, 1996.
 51. FARBIARTZ, S. R.; CARVALHO, T. U.; ALVIANO, C.; SOUZA, W. Inhibitory effect of melanin on the interation of *Fonsecaea pedrosoi* with

- mammalian cells *in vitro*. *J. Med. Vet. Mycol.*, Dorchester. v.30, p. 265-273, 1992.
52. FRANCO, L.; GOMEZ, I.; RESTREPO, A. Saperconazole in the treatment of systemic and subcutaneous mycoses. *Int. J. Dermatol.* Philadelphia. v.31, p.725-729, 1992.
 53. FRANZ, R.; KELLY, S. L.; LAMB, D.C.; KELLY, D. E.; RUHNKE, M.; MORSCHHAUSER, J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* Washington. v.42, p.3065-3072, 1998.
 54. GARNER, A.; ARATHOON, E.; STEVENS, D.A. Initial experience in therapy for progressive mycoses with itraconazole, the first clinically studied triazole. *Rev. Infect. Dis.*, Chigago. v.9, supl.1, p. 77-86, 1987.
 55. GHANNOUM, M. A. Is antifungal susceptibility testing useful in guiding fluconazole therapy? *Clin. Infect. Dis.* Chigago. v.22, supl.2, p.161-165, 1996.
 56. GHANNOUM, M. A.; REX, J. H. AND GALGIANI, J. N. Susceptibility testing of fungi: current status of correlation of in vitro data with clinical outcome. *J. Clin. Microbiol.*, Washington. v.34, p. 489-495, 1996.
 57. GOMES, M. H. R.; RESENDE, M. A. *Fonsecaea pedrosoi*: lipid composition and determination of susceptibility to amphotericin B. *Can. J. Microbiol.* Ottawa. v.38, p.209-214, 1992.
 58. GREENE, J. N.; FOULIS, P.; YANGCO, B. G. Case report: Chromomycosis in a steroid dependent patient with chronic obstructive

- pulmonary disease. *Am. J. Med. Sci. Thorofare.* v.299, supl.1, p.54-57, 1990.
59. GUARRO, J.; LLOP, C.; AGUILAR, C.; PUJOL, I. Comparison of in vitro antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.41, p. 2760-2762, 1997.
 60. GUPTA, A K.; SAUDER, D.N.; SHEAR, N.H. Antifungal agents: An overview. Part I. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.30, p.677-698, 1994
 61. GUPTA, A K.; SAUDER, D.N.; SHEAR, N.H. Antifungal agents: An overview. Part II. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis. v.30, p.911-933, 1994.
 62. GUPTA, A K.; SHEAR, N.H. Pharmacokinetics and pharmacology of terbinafine and itraconazole. *J. Am. Acad. Dermatol.* St. Louis. v.38, supl., p.42-47, 1998.
 63. GUPTA, A K.; SHEAR, N.H. Terbinafine: an update. *J. Am. Acad. Dermatol.* St. Louis. v.37, p.979-988, 1997.
 64. HARADA, S.; KUSUNOKI, T. Scanning electron microscopic observation of the parasitic forms of *Fonsecaea pedrosoi* in a human skin lesion. *Mycopathologia.* The Hague. v.82, p.33-37, 1983.
 65. HAZEN, E.L., BROWN, R., Two antifungal agents produce by a soil actinomyces. *Cience.* v.112, p.423, 1950. Apud: GUPTA, A K.; SAUDER, D.N.; SHEAR, N.H. Antifungal agents: An overview. Part I. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.30, p.677-698, 1994

66. HAZEN, K.C. Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: An in vitro comparison. *J. Am. Acad. Dermatol.* St. Louis. v.38, suppl., p.37-41, 1998.

67. HELMERHORST, E. J.; REIJNDERS, I. M.; HOF, W. V.; SIMOONS-SMIT, I.; VEERMAN, E. C. I.; AMEROGEN, A. V. N. Amphotericin B and fluconazole resistant *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus*, and other newly emerging pathogenic fungi are susceptible to basic antifungal peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington. v.43, p.702-704, 1999.

68. HENNEQUIM, C.; LABENNE, M.; BENKERROU, M; HAMBOURG, M. Fluconazole resistant *Candida albicans* in an immunocompetent child. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago. v.19, p. 1179-1180, 1994.

69. HIEMENZ, J. W.; WALSH T. J.; lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. *Clin. Infect. Dis.* Chicago, n.22, suppl.2, p.133-144, 1996.

70. JACOBSON, E. S.; HOVE, E.; EMERY, H. S. Antioxidant function of melanin in black fungi. *Infect. Immun.*, Washington. v.63, p. 4944-4945, 1995.

71. JACOBSON, E. S.; JENKINS, N.D.; TODD, J. M. Relationship between superoxide dismutase and melanin in pathogenic fungus. *Infect. Immun.*, Washington. v.62, p. 4085-4086, 1994.

72. JOHNSON, E. M.; RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. *In vitro* resistance to imidazole antifungals in *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* London. v.13, p.547-558, 1984.

73. KANO, K. Über die Chromoblastomykose durch einen noch nicht als Pathogen beschriebenen Pilz: *Hormiscium dermatitidis* n. Sp. *Arch. Derm. Syph. Berl.*, v.179, p.282-294, 1937. Apud: AL - DOORY, Y. Chromomycosis. Missoula: Mountain Press, 1972, 203p.
74. KULLAVANIJAYA, P.; ROJANAVANICH, V. Successful treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* by the combination of itraconazole and cryotherapy. *In. J. Dermatol.*, Philadelphia, v.34, n.11, p. 804-807, 1995.
75. KUMAR, B.; KAUR, I.; CHAKRABARTI, A. SHARMA, V. K. Treatment of deep mycoses with itraconazole. *Mycopathologia*. The Hague. v.115, p.169-174, 1991.
76. LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Cromomicose. *In: Micologia médica, fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8. ed. São Paulo: Savier., 1991. p. 376 - 386.
77. LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. *Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico.*, 1. ed. São Paulo: Sarvier., 1998. p. 232-237.
78. LANE, C. G. A cutaneous Lesion caused by a new fungus *Phialophora verrucosa*., *J. Cutan. Dis.* v.33, p.840-848, 1915.
79. LARONE, D. H. The identification of dematiaceous fungi. *Clin. Microbiol. Newsl.*, Washington. v.11, n.19, p. 145-52, 1989.
80. LARONE, D. H. *Medically important fungi - A guide to identification*. 3^a ed. Washington: American Society for Microbiology, ASM Press, 1995. p.121-128.

81. LAVALLE, P. Chromoblastomycosis in Mexico. In: FIFTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE MYCOSES. Caracas, 1980. *Superficial cutaneous and subcutaneous infections*. Washington: Pan Am. Health Organ. Sci. Publ. n. 396, 1980, p. 235-247.

82. LAVALLE, P.; SUCHILL, P.; DE OVANDO, F. Itraconazole for deep mycoses: preliminary experience in Mexico. *Rev. Infect. Dis.* Chicago. v.9, supl.1, p. 64-70, 1987.

83. LEE, M. W.; HSU, S.; ROSEN, T. Spores and mycelia in cutaneous chromomycosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* St. Louis. v.39(5 Pt 2), p. 850-852, 1998.

84. LEENDERS, A. C. A.; DAENEN, S.; JANSEN, R. L. H.; HOP, W. C. J.; LOWENBERG, B. WIJERMAN, P. W.; CORNELISSEN, J.; HERBRECHT, R.; LELIE, H. V. D.; HOOGSTEDEN, H. C.; VERBRUGH, H. A.; MARIE, S. Liposomal amphotericin B compared with amphotericin deoxycholate in the treatment of documented and suspected neutropenia-associated invasive fungal infections. *Br. J. Haematol.* Oxford. v.103, p.205-212, 1998.

85. LI, C.; WU, S. Chromoblastomycosis in China. In: 13^o CONG. INT. SOC. HUM. MYCOL. - ISHAM, Parma, 1997. *Abstr.* p.116.

86. LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. Cromoblastomicose no interior do Estado do Rio Grande do Sul. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro. v.64, n.3, p. 155-8, 1989.

87. LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. Chromomycosis: A clinical and mycologic study of thirty-five cases observed in the hinterland of Rio Grande Do Sul, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.25, p. 132-5. 1976.

88. LOPES, C. F.; ALVARENGA, R. J.; CISALPINO, E. O.; RESENDE, M. A. Casos de cromomicose resistentes à 5-fluorocitosina. *An. Bras. Dermatol.* Rio de Janeiro. v.53, p.1-9, 1978.
89. LOPES, C. F.; ALVARENGA, R. J.; CISALPINO, E. O.; RESENDE, M. A.; OLIVEIRA, L. G. Six years' experience in treatment of chromomycosis with 5-fluorocytosine. *Int. J. Dermatol.*, Philadelphia. v.17, n.5, p. 414-418, 1978.
90. LOPES, C. F.; FRANCO, H. D.; RESENDE, M. A.; OLIVEIRA, L. G.; ALVARENGA, ROBERTO J. Butil – Simpatol no tratamento de um caso de cromomicose. *An. Bras. Dermatol.* Rio de Janeiro. v.48, p.265 – 268, 1973.
91. LOPES, C. F.; RESENDE, M. A.; ALVARENGA, R. J.; MOREIRA, Y. K. Associação de 5-fluorocitosina e amphotericina B no tratamento da cromomicose. *Med. Cutan. Ibero Lat. Amer.*, v.7, n.1/3, p. 1-7, 1979.
92. LYNCH, M. E.; SOBEL, J. D.; FIDEL JR., P. L. Role of antifungal drug resistance in the pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *J. Med. Vet. Mycol.* Dorchester. v34, p.337-339, 1996.
93. MATSUMOTO, T.; PADHYE, A. A.; AJELLO, L.; STANDARD, P. G.; MCGINNIS, M. R. Critical review of human isolates of *Wangiella dermatitidis*. *Mycologia*. Harlowe. v.76, n.2, p.232-249, 1984.
94. MATTE, S. M. W.; LOPES, J. O.; MELO, I. S.; ESPADIM, L. E. R.; PINTO, M. S. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Brasília. v.30, n.4, p. 309-311, 1997.

95. MCBURNEY, E. I. Chromoblastomycosis treatment with ketoconazole. *Cutis*. New York. v. 30, p.746-748, 1982.
96. MCGINNIS, M. R. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology., *J. Am. Acad. Dermatol.* St. Louis. v.8, p. 1-16, 1983.
97. MCGINNIS, M. R. *Laboratory Handbook of medical mycology*. New York: Academic Press, 1980, 661p.
98. MCGINNIS, M. R.; PASSARELL, L. *In vitro* testing of susceptibilities of filamentous ascomycetes to voriconazole, itraconazole, and anfotericina B, with consideration of philogenectic implications. *J. Clin. Microbiol.*, Chicago. v.36, p. 2353-2355, 1998.
99. MCGINNIS, M. R.; PASSARELL, L. *In vitro* evaluation of terbinafine and itraconazole against dematiaceous fungi. *Med. Mycol.*, Plymouth.v.36, p.243-246, 1998.
100. MCGINNIS, M. R.; PASSARELL, L.; SUTTON, D.A.; FOTHERGILL, A.W.; COOPER JR, C.R.; RINALDI, M.G. *In vitro* activity of voriconazole agaist selected fungi. *Med. Mycol.*, Plymouth. V.36, p.239-242, 1998.
101. MCGINNIS, M. R; RINALDI, M.G. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biologic fluids, *In* Lorian V., *Antibiotics in laboratory medicine*, 3^a ed. Baltimore: The Willians & Wilkins Co., 1991. p. 198-257.
102. MCGINNIS, M. R.; SCHELL, W.A. The genus *Fonsecaea* and its relationship to the genera *Cladosporium*, *Phialophora*, *Ramichloridium*, and *Rhinocladiella*. In:FIFTH INTERNATIOSNAL CONFERENCE ON

- THE MYCOSES. *Superficial cutaneous and subcutaneous infections*. Caracas, 1980. Pan Am. Health Organ. Sci. Publ. 1980. n.396, p. 215-234.
103. MCKINSEY, D. S.; KAUFFMAN, C. A.; PAPPAS, P. G.; CLOUD, G. A.; GIRARD, W. M.; SHARKEY, P. K.; HAMIL, R. J.; THOMAS, C. J.; DISMUKES, W. E. and national institute of allergy an infections diseases mycoses study group. Fluconazole therapy for histoplasmosis. *Clin. Infect. Dis.* Chicago. v.23, p.996-1001, 1996.
 104. MEDLAR, E. M. A cutaneous infection caused by a new fungus *Phialophora verrucosa* with a study of the fungus. *J. Med. Res.* v.32, p.507-522, 1915.
 105. MEDOFF, G., KOBAYASHI, G.A. The polyenes. In: SPELLER, D.C.E. ed. *Antifungal chemotherapy*. Chichester: John Wiley & Sons, 1980, p.3-33. Apud: GUPTA, A K.; SAUDER, D.N.; SHEAR, N.H. Antifungal agents: An overview. Part I. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.30, p.677-698, 1994
 106. MEHTA, J.; CHU, P.; POWLES, R.; KELSEY, S. Amphotericin B lipid complex for the treatment of presumed or confirmed fungal infections in immunocompromised patients with hematologic malignancies. *Drugs of Today*. Barcelona. v.32, supl. G, p.27-32, 1996.
 107. MITTAG, H., KREYSEL, H. W. Klinik, Diagnostik und therapie der chromomykose. *Mycosen*. Berlin. v.25, n.8, p.413-423, 1982.
 108. MONTPELLIER, J., CATANEI, A. Ann. Dermat. Syph., v.8, p.626, 1927. Apud: AL - DOORY, Y. *Chromomycosis*. Missoula: Mountain Press, 1972, 203p.

109. MOORE, M., ALMEIDA F. de. Etiologic agents of chromoblastomycosis (chromoblastomycosis of Terra, Torres, Fonseca and Leão, 1922), of North and South America. *Rev. biol. Hyg. (S. Paulo)*, v.6, p.94-97, 1935. Apud: AL - DOORY, Y. *Chromomycosis*. Missoula: Mountain Press, 1972, 203p.
110. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) Reference method for broth dilutions antifungal susceptibility testing of yeasts; approved stanrd. Villanova, NCCLS, 1992. v.12. M27- P.
111. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) Reference method for broth dilutions antifungal susceptibility testing of yeasts; approved stanrd. Villanova, NCCLS, 1997. v.17. M27- A.
112. NEGRONI, P. Estudio micologico del primer caso argentino de cromomycosis *Fonsecaea* (n.g.) *pedrosoi* (Brumpt, 1921). *Rev. Inst. bact. Malbrán*. V.7, p.419-426, 1936. Apud: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Cromomycose. In: *Micologia médica, fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8. ed. São Paulo: Savier., 1991. p. 376 - 386.
113. ODDS, F. C.; ARAI, T.; DISALVO, A. F.; EVANS, E. G. V.; HAY, R. J.; RANDHAWA, H. S.; RINALDI, M. G.; WALSH, T. J. Nomenclature of fungal disease: a report and recommendations from a sub-committee of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM). *J. Med. Vet. Mycol.*, Dorchester. v.30, p. 1-10, 1992.
114. ODDS, F. C. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. *J. Antimicrob. Chemother.*, London. v.31, p. 46-71, 1993.

115. OKEKE, C. N.; GUGNANI, H. C. In vitro sensitivity of environmental isolates of pathogenic dematiaceous fungi to azole compounds and a phenylpropyl-morpholine derivative. *Mycopathologia*. The Hague. v.99, p.175-181, 1987.

116. PADHYE, A. A.; HAMPTON, A. A.; HAMPTON, M. T.; HUTTON, N. W.; PREVOST-SMITH, E. AND DAVAS, M. S. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago. v.22, p. 331-335, 1996.

117. PAUGAM, A.; DUPOUY-CAMET, J.; BLANCHE, P. ; GANGNEUX, J. P.; TOURTE-SCHAEFER, C.; SICARD, D. Increased Fluconazole resistance of *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS and recurrent meningitis. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago. v.19, p.975-976, 1994.

118. PEDROSO, A.; GOMES, J. M. Sobre quatro casos de dermatite verrucosa produzida pela *Phialophora verrucosa*. *Ann. Paulistas de Medicina e Cirurgia*, São Paulo. v.11, p.53-61, 1920.

119. PEREZ - BLANCO, M.; FERNÁNDEZ - ZEPPENFELDT, G.; HERNÁNDEZ, R.; YEGRES, F.; BORELLI, D. Cromomicosis por *Rhinoctadiella aquaspersa*: descripción del primer caso en Venezuela. *Rev. Iberoam. Micol.*, Bilbao. v.15, p. 51-54, 1998.

120. PFALLER, M. A.; BALE, M.; BUSCHELMAN, B.; LANCASTER, M.; ESPINEL-INGROFF, A.; REX, J. H.; RINALDI, M. G.; COOPER, C. R.; MCGINNIS, M. R. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards – recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, Fluconazole and Flucytosine. *J. Clin. Microbiol.* Washington. v.33, p.1104-1107, 1995.

121. POLACK, A. Mode of action of 5-fluorocytosine and 5-fluorouracil in dematiaceous fungi. *Sabouraudia.*, v.21, p. 15-25, 1983.

122. PURSLEY, T. J.; BLOMQUIST, I. K.; ABRAHAM, J.; ANDERSEN, F.; BARTLEY, J. A. Fluconazole - induced congenital anomalies in three infants. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago. v.22, p. 336-340, 1996.

123. QUEIROZ-TELLES, F. A cromoblastomicose no Estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Brasília. v.30, n.4, p. 345-346., 1997.

124. QUEIROZ-TELLES, F.; PURIM, K. S. FILLUS, J. N.; BORDIGNON, G. F.; LAMEIRA R. P.; CUSTEM, J. V. CAUWENBERGH, G. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. *Int. J. Dermatol.*, Philadelphia. v.31, p. 805-812. 1992.

125. QUEIROZ-TELLES, F.; WANKE, B. W.; MONTEIRO, P. C. F.; BORDIGNON, G. F.; RAMOS, L. R.; LONDERO, A. T. Chromoblastomycosis caused by different species of *Exophiala*. In: XXXII CONGRESSO DA SBMT, 1996. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 29, supl 1, p.117.

126. RADFORT, S. A ; JOHNSON, E.M.; WARNOCK, D.W. In vitro studies of activity of voriconazole (UK – 109,496), a new triazole antifungal agent, against emerging and less-common mold pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington. v.41, p. 841-843, 1997.

127. RESENDE, M. A. Ação sinérgica da anfotericina B e da 5-fluorocitosina em *Fonsecaea pedrosoi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. São Paulo. v.21, n.6, p.344-346, 1979.

128. RESENDE, M. A. Testes de susceptibilidade de amostras de *Fonsecaea pedrosoi* à associação de tiabendazol e anfotericina B *in vitro*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. São Paulo. v.21, n.6, p.347-349, 1979.

129. RESENDE, M. A.; CALIGIORNE, R. B.; MELILLO, P. H. C.; PELUSO, C. P. *In vitro* suscetibility of chromomycosis and phaeohyphomycosis to antifungal drugs. In: 13^o CONG. INT. SOC. HUM. MYCOL. – ISHAM. Parma, 1997. *Abstr.* p.196.

130. RESENDE, M. A.; OLIVEIRA, L. G.; LOPES, C. F.; CISALPINO, E. O. Testes de susceptibilidade de agentes da cromomicose à 5-fluorocitosina e ao butil-simpatol (vasculat). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Brasília. v.9, n.2, p.73-77, 1973.

131. RESTREPO, A. Treatment of tropical mycosis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis. v.31, supl. 3Pt2, p.91 -102, 1994.

132. REX, J. H.; PFALLER, M. A; LANCASTER, M.; ODDS, F. C.; BOLMSTROM, A.; RINALDI, M. G. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards – recommended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. *J. Clin. Microbiol.* Washington. v.34, p.816-817, 1996.

133. REX, J. H.; PFALLER, M. A; RINALDI, M. G.; POLACK, A.; GALGIANI, J. N.; Antifungal Susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.* Washington. v.6, p. 367-381. 1993.

134. REYNOLDS, J. E. F.ed. *Martindale - The Extra Pharmacopoeia*. 31. ed. . London: The Royal Pharmaceutical Society, 1996. p. 393-417.

135. RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. *Fungal infection: diagnosis and management*. Oxford: Blackwell., 1993. p. 17 - 42.
136. RICHTER, S.; CORNICAN, M. G.; PFALLER, M. A.; LEE, C. K.; GINGRICH, R.; RINALDI, M. G.; SUTTON, D. A. Fatal disseminated *Trichoderma longibrachiatum* infection in an adult bone marrow transplant patient: species identification and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.*, Washington. v.37, n.4, p. 1154-1160, 1999.
137. RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*. v.42, p.265-270, 1950. Apud: MCGINNIS, M. R. *Laboratory Handbook of medical mycology*. New York: Academic Press, 1980. 661p.
138. RIPPON, J. W. The Subcutaneous Mycoses - Chromoblastomycosis. In: Rippon, J. W.- *Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1982. p. 276-296.
139. ROMERO, A.; TREJOS, A. La cromoblastomicosis in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, v.1, p. 95-115, 1953.
140. RUDOLPH, M. Über die Brasilianische "Figuera" (Vorläufige Mitteilung). *Arch. Schiffs-Tropenhyg.*, v.18, p. 498-9, 1914. Apud: CASTRO, R. M.; CASTRO, L. G. M. On the priority of Description of chromomycosis. *Mycosen*. Berlin. v.30, n. 9, p. 397-403, 1987.
141. RYDER, N.S.; FRANK, I. Interacion of terbinafine with human serum and serum proteins. *J. Med. Vet. Mycol.*, Dorchester. v.30, p. 451-460. 1992.

142. RYDER, N.S. - Specific inhibition of fungal sterol biosynthesis by SF86-327, a new allylamine antimicotic agent. *Antimicrobiol. Agents Chemothe.*, Washington. v.27, p. 252-256, 1985.

143. RYDER, N.S. Terbinafine: mode of action and properties of squalene epoxidase inhibition. *Br. J. Dermatol.*, Oxford. v.126, supl.39, p. 2-7, 1992.

144. RYLEY, J. F.; WILSON, R. G.; GRAVESTOCK, M. B.; POYSER, J. P. Experimental approaches to antifungal chemotherapy. *Adv. Pharmacol. Chemother.*, New York. v.18, p. 49-176, 1981.

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

146. SANCHEZ-MIRT, A.; ROMERO, H.; FERNANDEZ-ZEPPENFELDT, G. Growth and morfology of *Cladophialophora (Cladosporium) carrionii*. *J. Mycol. Méd. Paris*. v.7, p.1-4, 1997.

147. SAUERTEIG, E.; HERNÁNDEZ, R.; SALFELDER, K.; BASTIDAS, C. Acute chromomycosis provoked by an insect bite in an immunosuppressed patient. *Mycosen*. Berlin, v.41, p.191-194, 1998.

148. SCHELL, W. A.; PASARELL, L.; SALKIN, I. F.; MCGINNIS, M. R. *Bipolaris*, *Exophiala*, *Scedosporium*, *Sporothrix*, and other dematiaceous fungi. In Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C. and Yoken, R. H. (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 6° ed. Washington: American Society for Microbiology, ASM Press, 1995. p. 852-846.

149. SCHELL, W. A.; MCGINNINS, M. R.; BORELLI, D. – *Rhinocladiella aquaspersa*, a new combination for *Acrotheca aquaspersa*. *Mycotaxon*. v.17, p.341-348, 1983.

150. SCHMALRECK, A.F., KOTTMANN, I., REISER, A., RUFFER, U., VANCA, E. Susceptibility testing of yeasts against fluconazole: comparison of Etest method with microdilution and agar dilution. *Mycoses*. Berlin. v.39, suppl. 2, p. 31-38, 1996.

151. SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A. Susceptibility testing of Antifungal Agents,. In: LENNETTE, E.H., SPAUDING, E. H. AND TRUANT, J.P. ed., *Manual of Clinical Microbiology*, 2º ed. Washington: American Society for Microbiology, ASM Press, 1974. p.569-574.

152. SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A. Laboratory studies with Antifungal Agents: Susceptibility tests and bioassays. In: Lennette, E.H., Balows, A., Hausler W.J. and Shadomy, H.J. ed., *Manual of Clinical Microbiology*, 4º ed. Washington: American Society for Microbiology, ASM Press, 1985. p.991-999.

153. SHADOMY, S. AND PFALLER, M. A. Laboratory Studies with antifungal agentes: Susceptibility tests and quantitation in body fluids. In: Balows, A., Hausler, W. J. Jr., Hermann,K. L., Isenberg, H. D., and Shadomy, H. J. (ed), *Manual of Clinical Microbiology*, 5º ed. Washington: American Society for Microbiology, ASM Press, 1991. p. 1173-1181.

154. SHAWAR, R., PAETZNICK, V., WITTE, Z., ENSIGN, L. G., ANAISSIE, E. LA ROCCO, M. Collaborative investigation of broth microdilution and semi- solid agar dilution for in vitro suscepibility testing of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* Washington. v.30, p. 1976-81, 1992.

155. SILVA, A. C. M.; MORAES, M. S. C.; NASCIMENTO, J. L.; SILVA, C. C. M.; PORTELA, Y. M. C.; MARQUES, S.; CAMARGO, Z. P. E COSTA, J. M. L. Estudo epidemiológico da cromomicose na microrregião da baixada ocidental maranhense - municípios de Anajatuba e Alcântara. *Anais do Congresso Brasileiro de Medicina Tropical*. 1991. p. 272,.
156. SILVA, C. M. P.; SILVA, A. C. M.; MARQUES, S.; SALDANHA, A. C.; NASCIMENTO, J. D'ARC L.; BRANCO, M. R. F. C.; SILVA R. R.; COSTA, J. M. L. Associação de cromoblastomicose e hanseníase: relato de dois casos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Brasília. v.27, n.4, p. 241-244, 1994.
157. SILVA, A. C. M.; NETO, A. S.; GALVÃO, C. E.; MARQUES, S.; SALDANHA, A. C.; SILVA, C. C. M.; FISCHMAN, O.; SILVA, R. R.; COSTA, J. M. L. Cromoblastomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no estado do Maranhão. I - Aspectos clínicos, epidemiológicos e evolutivos. *Rev. Socied. Bras. Med. Trop.*, Brasília. v.25, n.1, p. 37-44, 1992.
158. SILVA, C. M. P.; ROCHA, R. M.; MORENO, J. S.; BRANCO, M. R. F. C.; SILVA R. R.; MARQUES, S. G.; COSTA, J. M. L. - O babaçu (*Orbigna phalerata Martins*) como provável fator de risco de infecção humana pelo agente da cromoblastomicose no Estado do Maranhão, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Brasília. v.28, n.1, p. 49-52, 1995.
159. SILVA, J. P.; DINIZ, J. A. P.; RONZENTAL, S. Cromoblastomicose no Estado do Pará: uma revisão (de 1942 à 1997) dos últimos 55 anos. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, Rio de Janeiro. 1998. ANNAIS. p. 90.

160. SILVA, J. P.; SOUZA, W.; RONZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic region (Brazil). *Mycopathologia*. The Hague. v.143, p.171-175, 1999.
161. SOARES, R. M.A.; ANGLUSTER, J. SOUZA, W.; ALVIANO, C. S. Carbohydrate and lipid components of hyphae and conidia of human pathogen *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycopathologia*. The Hague. v.132, p.71-77, 1995.
162. SOARES, M. M. S. R. Incidência de dermatofitose podal em diferentes classes de indivíduos e antibiograma dos fungos isolados. São Paulo. 1993. 199p. (Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).
163. SOARES, M. M. S. R. Tinea pedis e agentes etiológicos: avaliação terapêutica e antibiograma dos dermatófitos isolados. São Paulo. 1998. 193p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).
164. SOKOL-ANDERSON, M. L.; BRAJTBURG, J.; MEDOFF, GERALD, M. Amphotericin B - induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* London. v.154, p. 76-83, 1986.
165. SOLANO, A. E. - Tratamiento de la cromoblastomycosis com thiabendazole. *Med. Cut. ILA*. v.3, p.277-282, 1966.
166. TERRA, F., TORRES, M., FONSECA FILHO, O. ARÊA LEÃO, A.E. Novo tipo de dermatite verrucosa; micose por *Acrotheca* com associação de leishmaniose. *Brasil Médico*, v.36, p.363-8, 1922. Apud: AL - DOORY, Y. Chromomycosis. Missoula: Mountain Press, 1972, 203p.

167. TORTORANO, A.M. Comparison of three methods for testing azole susceptibilities of *Candida albicans* strains isolated sequentially from oral cavities of AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* Washington. v.36, p. 1578-83, 1998.
168. TREJOS, A. - *Cladosporium carrionii* n. sp. And the problem of *Cladosporia* isolated from chromoblastomycosis. *Rev. Biol Trop.*, v.2, p. 75-111, 1954.
169. TUMBARELLO, M.; BEVILACQUA N.; FEDERICO, G.; MORACE, G.; CAUDA, R.; TACONELLI, E. Fluconazole-Resistant *Candida parapsilosis* fungemia in a patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* Chicago. v.22, p.179-180. 1996.
170. VANDEN BOSSCHE, H. Mechanisms of antifungal resistance. *Revista Iberoamericana de micologia.*, Bilbao. v.14, p.44-9. 1997
171. VANDEN BOSSCHE, H.; DROMER, F.; IMPROVISI, I.; LOZANO-CHIU,M.; REX, J.H.; SANGIARD, D. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. In: Proceedings of the XIV Congress Int. Soc. Hum. Mycol. - ISHAM, Parma 1997., *Medical Mycology*. v.36, supl.1, p. 119-128. 1998.
172. VANDEN BOSSCHE, H.; WARNOCK, D. W.; DUPONT, B.; KERRIDGE, D.; GUPTA, S. S.; IMPROVISI, L.; MARICHAL, P.; ODDS, F. C.; PROVOST, F.; RONIN, O. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. *J. Med. Vet. Mycol.* Dorchester. v.32, supl., p.189-202, 1994.

173. VENUGOPAL, P. V.; VENUGUPAL, T. V. *In vitro* susceptibility of filamentous fungi to itraconazole. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, Edinburgh. v.38, p. 345-348, 1995.

174. WHEAT, J.; MARICHAL, P.; VANDEN BOSSCHE, MONTE, A.; CONNOLLY, P. Hypothesis on the mechanism of resistance to fluconazole in *Histoplasma capsulatum*. *Antimicrob.Agents. Chemother.* Washington. v.41, p.410-414, 1997.

175. WHEELER, M. H.; BELL, A. A. Melanins and their importance in pathogenic fungi. In: McGinnis, M. R. ed. *Current topics in medical mycology*. V.2 New York: Springer - Verlag, 1987. p. 338-387.

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

177. YANASE, K., YAMADA, M. Pocket warmer therapy of chromomycosis. *Arch. Dermatol.*, v.114, p.1095, 1978. Apud: RIPPON, J. W. The Subcutaneous Mycoses - Chromoblastomycosis. In: Rippon, J. W.- *Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1982. p. 276-296.

178. YOSHIDA, T.; JONO, K.; ONOGI, K. Modified agar diluition susceptibility testing method for determining in vitro activities of antifungal agents, including azole compounds. *Antimicrob.Agents. Chemother.* Washington. v.41, p.1349-1351, 1997.

179. YU, R. Successful treatment of chromoblastomycosis with itraconazole. *Mycoses*. Berlin. v.38, p.79-83, 1995.

180. YU, R. Y.; GAO, L. Chromoblastomycosis successfully treated with fluconazole. *Int. J. Dermatol.* v.33, p.716-719, 1994.
181. YU, T. C. On the development of antifungal agents: perspective of the U.S. Food and Drug Administration. *Clin. Infect. Dis.* Chicago. v.19, supl., p.54-58, 1994.
182. ZEPPENFELDT, G. RICHARD-YEGRES, YEGRES, F.; HERNÁNDEZ, R. *Cladosporium carrionii*: hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomycosis en Venezuela. *Rev. Iberoam. Micol.* v.11, p. 61-63, 1994