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

**Avaliação da sensibilidade *in vitro* de agentes causadores de cromoblastomicose
frente a diferentes antifúngicos, isolados e associados**

Viviane Mazo Fávero Gilmenes

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

**Orientador:
Profa. Assoc. Arlete Emily Cury**

**São Paulo
2003**

Viviane Mazo Fávero Gimenes.

Avaliação da sensibilidade *in vitro* de agentes causadores de cromoblastomicose frente a diferentes antifúngicos, isolados e associados.

**Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Profa. Dra. Arlete Emily Cury
Orientadora /Presidente**

Dr. Sandro Rogério de Almeida

Dra. Maria Valderez Szesz

São Paulo, 29 de setembro de 2003 .

À DEUS

Ao meu grande amor, Paulo Cezar

A minha vida, Isadora

Aos meus pais, Luiz e Verônica, meus irmãos Márcio Luiz e Fernando Henrique, a minha adorável irmã Valérie e minha eterna vovó Tranqüila.

Pela força, amor e carinho que sempre me dedicaram.

À Sônia Regina Caramico Buratto do laboratório de Micologia e Parasitologia Clínicas FCF-USP, pela valiosa colaboração na execução dos trabalhos, aprendizado, amizade e carinho a mim concedidos durante todos estes anos de trabalho em comum.

Aos professores da disciplina de Micologia e Parasitologia Clínicas FCF-USP, Dr. Sandro Rogério de Almeida e Dra. Irene da Silva Soares, pelo apoio e atenção.

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

À Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem e Dra. Maria Walderez Szeszs, pelo incentivo, colaboração, aprendizado, sugestões, amizade e carinho com que me receberam no Instituto Adolfo Lutz.

Aos amigos e colaboradores do Instituto Adolfo Lutz, Sandra, Andrez e Mônica e todos os funcionários da seção de micologia pelo apoio e carinho.

Aos amigos que formam a equipe de pesquisadores do departamento de Micologia e Parasitologia Clínicas da FCF-USP, Karen, Marina, Eliver, Edgar, Tatiane, pelo espírito de coleguismo e trabalho em equipe.

Aos amigos que passaram pelo laboratório de Micologia e Parasitologia Clínicas da USP, Leila, Gislaine, Valdirene e Eliane pelo apoio e amizade.

Às secretárias Márcia, Sueli, Bene, Elaine e ao Jorge, pela orientação, paciência e amizade.

Às funcionárias do Departamento de Análises Clínicas, Marli, Cláudia, D. Maria, Dorlei, Carmem e a Rose que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

Sumário

I. Abreviaturas	1
II. Resumo	2
III. Abstract	3
IV. Introdução	5
1. Aspectos históricos e sinonímias	7
2. Epidemiologia	8
3. Etiologia	9
4. Manifestações clínicas	11
5. Diagnóstico diferencial	12
6. Diagnóstico laboratorial	13
6.1 Exame direto	13
6.2 Cultura	13
7. Tratamento da cromoblastomicose: atualidades e perspectivas	15
V. Propriedades gerais de alguns antifúngicos	19
1. Anfotericina B	20
2. 5-Fluorocitosina	27
3. Terbinafina	31
4. Cetoconazol	35
5. Itraconazol	41
6. Fluconazol	46

7. Griseofulvina	50
VI. Antifungigramas para agentes da cromoblastomicose	55
VII. Proposição e Objetivos	62
VIII. Material e Métodos	64
1. Pacientes	65
2. Microrganismos	66
3. Exames micológicos	66
3.1 Material biológico e exame direto	66
3.2 Cultivos	67
4. Cultivos para inóculo	67
5. Antifungigramas	68
5.1. Meios de cultura e soluções	68
5.1.1 Ágar Sabouraud dextrose	68
5.1.2 Meio Concentrado	68
5.1.3 Ágar tampão de fosfato	69
5.1.4 Tampão de fosfato	70
5.1.5 Solução de Tween 80	70
5.2 Antifúngicos e soluções de estoque	71
5.2.1 Diluições dos antifúngicos	72
5.2.1.1 Testes com antifúngicos isolados	72
5.2.1.2 Testes com antifúngicos associados	72
5.3 Inóculo	73

5.4 Execução dos testes	74
5.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima	74
5.4.2 Determinação da concentração fungicida mínima	75
5.5 Avaliação da atividade das drogas isoladas e associadas	75
IX. Resultados	78
X. Figura, quadros e tabelas	83
Figura 1. Curva de crescimento de <i>Fonsecaea pedrosoi</i> (cepa 33) em ágar batata a 30°C	84
Tabela 1. Procedência, exames micológicos e identificação de 18 pacientes com cromoblastomicose	85
Tabela 2. Concentração inibitória mínima de diferentes antifúngicos isolados frente a 40 cepas de agentes de cromoblastomicose	86
Tabela 3. Concentração fungicida mínima de diferentes antifúngicos isolados frente a 40 cepas de agentes da cromoblastomicose	87
Tabela 4. Atividade da anfotericina B e do itraconazol quando isolados associados contra cepas de agentes da cromoblastomicose	89
Tabela 5. Atividade da anfotericina B e da terbinafina quando isoladas e associadas contra cepas de agentes da cromoblastomicose	91
Tabela 6. Atividade da anfotericina B e do cetoconazol quando isolados associados contra cepas de agentes da cromoblastomicose	93
Tabela 7. Atividade da anfotericina B e da 5-fluorocitosina quando isoladas e associadas contra cepas de agentes da cromoblastomicose	95

Tabela 8. Atividade da anfotericina B e do fluconazol quando isolados associados contra cepas de agentes da cromoblastomicose	97
Tabela 9. Atividade da anfotericina B e da griseofulvina quando isoladas e associadas contra cepas de agentes da cromoblastomicose	99
Quadro 1. Dados gerais dos pacientes com amostras seqüenciais	101
Quadro 2. Dados clínicos dos pacientes com amostras seqüenciais	102
Tabela 10. Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de diversos antifúngicos frente às cepas isoladas de amostras seqüenciais de pacientes com cromoblastomicose	103
Tabela 11. Concentração inibitória fracionária e concentração fungicida fracionária de diversos antifúngicos frente às cepas isoladas de amostras seqüenciais de pacientes com cromoblastomicose	105
XI. Discussão	107
XII. Conclusão	127
XIII. Referências bibliográficas	130

LISTA DAS ABREVIATURAS

- 1.AnB: anfotericina B.
- 2.ASD: ágar Sabouraud dextrose
- 3.*C albicans*: *Candida albicans*
- 4.CIM: concentração inibitória mínima.
- 5.CFM: concentração fungicida mínima
- 6.CIF: concentração inibitória fracionária
- 7.CFF: concentração fungicida fracionária
- 8.Crio. criocirurgia
- 9..DMSO: dimetilsulfóxido
- 10.Ceto: cetoconazol
- 11.Fluco: fluconazol
- 12.Griseo: griseofulvina
- 13.Itra: itraconazol
- 14.Terb: terbinafina
- 15.5-FC: 5- fluorocitosina
- 16.*P*: *Phialophora*
- 17.YNP: yeast nitrogen base

RESUMO

GIMENES, V.M.F; CURY, A.E. (MESTRADO). Avaliação da sensibilidade *in vitro* de agentes causadores de cromoblastomicose frente a diferentes antifúngicos, isolados e associados.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a ação de diversos antifúngicos isolados e associados a anfotericina B contra amostras sequenciais ou não recuperadas de pacientes com cromoblastomicose e submetidas ou não a tratamento. A partir de 18 pacientes foram isoladas 39 cepas, submetidas a testes de diluição em ágar contendo anfotericina B, cetoconazol, itraconazol, terbinafina, 5-fluorocitosina, fluconazol ou griseofulvina. Com base nas CIMs e nas concentrações séricas desses antifúngicos verificou-se que as amostras foram, de modo geral, sensíveis ao cetoconazol, a terbinafina e ao itraconazol. Somente 13 amostras foram sensíveis a anfotericina, 7 a 5-FC, 2 ao fluconazol e nenhuma à griseofulvina. Com relação as CFMs, 2 cepas foram sensíveis a AnB, 11 ao itraconazol, 20 ao cetoconazol e 3 a 5-FC. Seis não responderam a terbinafina e 38 ao fluconazol. As combinações de antifúngicos resultaram em interações principalmente aditivas ou indiferentes. O estudo de isolados sequenciais evidenciou um ponto de corte para sensibilidade desses agentes ao itraconazol, correspondente a CIMs $\leq 0,06 \mu\text{g/ml}$ desse azol.

Palavras chaves: cromoblastomicose, fungos demáceos, antifúngicos, combinação de antifúngicos.

ABSTRACT

GIMENES, V.M.F; CURY, A.E. (MESTRADO). *In vitro* susceptibility assessment of agents of the chromoblastomycosis against different antifungals, isolated and combination (association).

The aim of the present work was to study the action of several antifungals isolated and combined with amphotericin B against sequential or non-sequential samples in patients infected with chromoblastomycosis and treated or not treated. Thirty nine strains from 18 patients were isolated and submitted to agar dilution testing containing amphotericin B, cetoconazole, itraconazole, terbinafine, 5-flucytosin, fluconazole or griseofulvin. Based on the CIMs and on the serum levels of these antifungals, the isolates were susceptible to ketoconazole, terbinafine and itraconazole. Only 13 of the isolates were susceptible to amphotericin; seven to 5-FC, two to fluconazole and none to a griseofulvin. Regarding the CFMs two strains were susceptible to AnB, 11 for itraconazole, 20 for ketoconazole and three for 5-FC. Six didn't respond to terbinafine and 38 for fluconazole. The combination of antifungals resulted in mainly additive or indifferent interaction. The study of the sequential isolated sample showed a breaking point for the susceptibility of these agents to itraconazole, corresponding CIMs $\leq 0,06\mu\text{g/ml}$ of this azole.

Palavras chaves: chromoblastomycosis, isolated, combination.

INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose é uma micose subcutânea, de evolução lenta e de difícil tratamento (AL DOORY. 1972). É causada por fungos da família Dematiaceae que vivem no solo ou em vegetais em decomposição. A aquisição da doença se dá geralmente por traumatismo por plantas ou objetos que veiculem um dos diversos agentes etiológicos. Após a penetração do fungo desenvolve-se um processo de infecção micótica com erupção de pápulas, verrugas ou nódulos que podem ulcerar (AL DOORY; 1972, MCGINNIS; 1983, LACAZ et al, 1998). A evolução é crônica e as manifestações clínicas são polimórficas. A localização é principalmente podal, mas pode haver comprometimento dos membros superiores. Apresenta caráter endêmico e ocorre com mais frequência entre a população rural de zonas tropicais e subtropicais, sendo considerada uma doença ocupacional (AL-DOORY, 1972). Em casos avançados determina deformidade e impotência funcional do membro acometido, com incapacitação permanente para o trabalho. No organismo do hospedeiro, o fungo sofre transformação de filamentoso para estruturas globosas de paredes espessas e acastanhadas, que se multiplicam por septação, em meio a uma reação inflamatória purulenta e granulomatosa. Essas estruturas são conhecidas como células muriformes, corpos fumagóides ou corpúsculos de Medlar e seu encontro é diagnóstico da doença. (CHANDLER et al, 1980; MEDLAR, 1915). Esses achados diferenciam a cromoblastomicose da feo-hifomicose e do eumicetoma, micoses causadas também pelos mesmos agentes etiológicos (MCGINNIS; PASSARELL;

1998). A cromoblastomicose não compromete o estado geral do paciente; por este motivo, a procura de serviço médico é tardia, dificultando o tratamento e aumentando as chances de freqüentes recidivas (CASTRO, 1992; ESTERRE et al, 1996a; QUEIROZ-TELLES et al, 1992). Em geral, o tratamento dessa micose constitui um desafio terapêutico, de modo que, embora diversos métodos e quimioterápicos sejam empregados em tentativas de cura ou controle da doença, a maioria fracassa.

Aspectos históricos e sinonímias

A primeira publicação sobre cromoblastomicose é atribuída a Max Rudolph (1914), que denominou “figueira” a doença causada por fungos negros em pacientes do Estado de Minas Gerais (RUDOLPH, 1987). Entretanto, essa micose já havia sido observada, mas não divulgada, por Alexandrino de Moraes Pedroso (1911), que denominou-a “blastomicose negra” e detectou o agente etiológico a partir de biópsia de um paciente do Estado de Goiás (apud CASTRO, 1998). As características do fungo nas lesões cutâneas foram depois descritas por Lane (1915) e Medlar (1915), que denominaram *Phialophora verrucosa*, o agente etiológico de uma dermatite verrucosa localizada em uma das nádegas de um jovem italiano, residente em Boston . Mais tarde, em 1920, Pedroso e Gomes publicaram quatro casos de “blastomicose negra” ocorridos no Brasil e, com base nos trabalhos de Lane e Medlar, referiram o agente isolado como *Phialophora verrucosa* (PEDROSO; GOMES, 1920).

Outras denominações como dermatite verrucosa, formigueiro, cromoblastomicose, dermatite verrucosa blastomicótica, doença de Pedroso, doença de Fonseca e Gomes foram também utilizadas para descrever essa micose. O termo cromoblastomicose foi introduzido por Terra em 1922 e, na atualidade, é considerado apropriado e indicado pela International Society for Human and Mycology (ODDS et al, 1992). Entretanto, a denominação cromomicose, criada por Moore e Almeida em 1935, tem sido aceita por diversos autores como a mais adequada para descrever a doença em questão.

Epidemiologia

Os fungos causadores de cromoblastomicose podem ser encontrados no solo de todo o mundo, mas as regiões tropicais e subtropicais apresentam maior frequência de casos. A doença tem caráter endêmico e ocorre principalmente entre a população de zonas rurais (AL-DORRY, 1972; BRYGOO; DESTOMBES, 1976; ESTERRE et al, 1996; OKEKE; GUGNANI, 1987; SILVA et al, 1998). O Brasil, onde a doença já foi observada em todas as regiões, é um dos países com maior número de casos relatados, com elevado índice nas regiões Norte e Nordeste (CORRADO 1982; MCGINNIS, 1983; SILVA et al, 1992; QUEIROZ-TELLES et al, 1992). Na cidade de Monte Negro, em Rondônia, constatou-se altíssima incidência de uma doença de pele causada por fungos isolados de restos de animais e detritos da floresta e alguns casos foram confirmados como cromoblastomicose.

Entre 1997 e 2001, foram detectadas dez ocorrências de doença com feridas na pele, o que proporciona uma taxa anual de 1,6 casos da doença por 10 mil habitantes. Entretanto, nessa localidade, a cromoblastomicose é diagnosticada, e frequentemente é confundida com leishmaniose tegumentar americana, que também é causadora de feridas na pele (PIVETA, 2002). A cromoblastomicose já foi também descrita em outros países. O Japão apresenta um número crescente de casos (FUKUSHIRO, 1983), e Madagascar, cuja taxa anual é de 1,2 casos por 10 mil habitantes, é referido como o país com maior índice de cromoblastomicose (PIVETA, 2002).

A cromoblastomicose é principalmente encontrada em adultos com 30 a 50 anos de idade, do sexo masculino, de regiões rurais (AL-DOORY, 1972; CASTRO, 1998; MCGINNIS, 1983; SILVA et al, 1999). Não se conhece predileção racial e contágio inter-humano (MCGINNIS, 1983; SILVA et al, 1999). A doença resulta da implantação traumática transcutânea de diversas espécies de fungos da família *Dematiaceae*, através de soluções de continuidade, sobretudo nos membros inferiores, embora uma variedade de formas clínicas de cromoblastomicose e sítios anatômicos envolvidos tenham sido relatados (LACAZ et al, 1991; MCGINNIS, 1983).

Etiologia

Até o momento, cinco espécies de fungos estão envolvidas na etiologia da cromoblastomicose: *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora* (*Cladosporium*) *carrionii* e

Rhinocladiella aquaspersa (MCGINNIS, 1983; RIPPON, 1982; LACAZ et al, 1991). Outras espécies, descritas como agentes etiológicos em alguns casos incluem *Wangiella (Exophiala) dermatitides*, *Exophiala spinifera*, *Exophiala jeanselmei* e *Exophiala castelanii* (BARBA-GÓMES et al, 1992; PADHYE et al, 1996; QUEIROZ- TELLES et al, 1996)

Independente do agente causador, essa micose é considerada bem definida e individualizada do ponto de vista clínico, anatomopatológico e micológico. Entretanto, alguns casos de lesões cutâneas, com características de dermatite verrucosa, podem ser determinados por manifestações de feo-hifomicose, nocardiose e levedurose. Na ilha de Madagascar, as principais espécies encontradas são *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora (Cladosporium) carrioni* (ESTERRE et al, 1996a). O último agente também é freqüentemente encontrado na Venezuela e na África do Sul (BRYGOO; DESTOMBES, 1976; ZEPPENFELDT et al, 1994). *Fonsecaea compacta* é mais comum na Rússia, Porto Rico, Martinica, Tennessee, Líbia e Cuba e *Fonsecaea pedrosoi* é comum na América Latina. (AL-DOORY, 1972; BRYGOO; DESTOMBES, 1976; RIPPON, 1982). Cromoblastomicose, causada por *Phialophora verrucosa* foi observada nos Estados Unidos, Japão e China (BRYGOO; DESTOMBES, 1976; LANE, 1915; LI ; WU, 1997)

Na Amazônia, nos últimos 55 anos, foram diagnosticados 325 casos de cromoblastomicose, tendo sido isolados *F. pedrosoi*, *P. verrucosa*, *C. carrionii* e raramente *Rhinocladiella aquaspersa* (SILVA et al, 1999). Em São Paulo, para a maioria dos casos diagnosticados no Hospital das Clínicas, o

agente etiológico foi *Fonsecaea pedrosoi*. Esses agentes são cosmopolitas, mas dependendo do clima ou da região, uns são isolados mais freqüentemente que os outros (BRYGOO; DESTOMBES, 1976; LACAZ et al, 1991; ZEPPENFELD et al, 1994).

Manifestações clínicas

O diagnóstico clínico da cromoblastomicose pode ser difícil devido à diversidade das lesões. Estas apresentam evolução crônica e podem iniciar como pápulas, verrugas ou nódulos que gradualmente aumentam de tamanho e, mais tarde, podem ulcerar. Em casos crônicos observam-se lesões nodulares, em placas infiltrativas ou eritematosas, cicatriciais, mas as verruciformes e tumorais são mais comuns. Algumas ulcerações adquirem aspecto papilomatoso, semelhante à couve-flor. As lesões se limitam à pele e ao tecido subcutâneo e a disseminação pode ocorrer por contigüidade ou através dos linfáticos superficiais. São bastante hemorrágicas e pode haver dor, prurido e odor desagradável (AL-DORRY, 1972; LACAZ et al, 1991).

Mais de um tipo clínico de lesão pode ser observado concomitantemente em um mesmo paciente. Uma característica marcante da cromoblastomicose é a presença de pequenos pontos negros nas lesões, que são a manifestação clínica do fenômeno de eliminação transepitelial do agente etiológico (GOETTE; ROBERTSON, 1984). Estes pontos negros ou “black dots” têm importância clínica, pois são locais ricos em parasitos, onde se consegue, seguramente, identificar o agente ao exame micológico direto.

Essa simples demonstração do fungo no exame direto do material da lesão e em culturas estabelece o diagnóstico da doença em questão (RIPPON, 1982), porque, clinicamente, as lesões de cromoblastomicose podem se confundir com outras doenças dermatológicas infecciosa ou não (LACAZ et al, 1991; RIPPON, 1982).

Entretanto, a doença não compromete o estado geral do paciente, mas em ausência de cuidados terapêuticos ocorrem infecção bacteriana secundária e edema. As lesões acometem principalmente a região podal, pernas e nádegas e raramente, mãos e braços. Existem relatos de lesões na região auricular, nasal e em outras partes do corpo (AL-DORRY, 1972; ARANGO et al, 1998; BITTENCOURT et al, 1994; BURKS et al, 1995).

Diagnóstico diferencial

As lesões de cromoblastomicose apresentam polimorfismo clínico, o que justifica sua diferenciação de uma série de processos cutâneos de natureza infecciosa e não infecciosa. Entre as doenças infecciosas destacam-se as verrugas e papilomas de etiologia viral, a tuberculose cutânea, micobacterioses, hanseníase e a leishmaniose cutânea, assim como a sífilis terciária, entre outras. Entre as micoses subcutâneas, incluem-se a esporotricose, os micetomas, a lobomicose, a feohifomicose e a paracoccidioidomicose. Das causas não infecciosas, as neoplasias são os principais diagnósticos diferenciais de cromoblastomicose (LACAZ et al, 1991; RIPPON, 1982).

Diagnóstico laboratorial

Exame direto

O diagnóstico laboratorial é realizado a partir da remoção de pontos negros da lesão por raspagem com lâmina de bisturi ou por biópsia. O agente causador pode ser identificado através do exame direto. São observadas estruturas demáceas, globosas, septadas ou não, em geral aglomeradas, denominadas corpos fumagóides, corpos escleróticos ou células muriformes, no material biológico clarificado com KOH, confirmando a etiologia fúngica da cromoblastomicose. Em ocasiões, observam-se hifas demáceas septadas, em amostras da epiderme (MCGINNIS, 1983).

Cultura

Os agentes causadores da cromoblastomicose formam colônias escuras, de aspecto aveludado e crescimento lento. Não são diferenciáveis em seu aspecto macroscópico (LACAZ et al,1998; MCGINNIS; SCHELL, 1980; LARONE, 1989; LARONE, 1995)

A observação microscópica dos cultivos mostra que *Fonsecaea pedrosoi* é um fungo polimórfico com três tipos de esporulação. O tipo cladospório, com conidióforos eretos, escuros, a partir dos quais os conídeos se desenvolvem por brotamento e permanecem unidos por disjuntores, formando cadeias ramificadas. O tipo rinocladiela mostra conidióforos

simples, com várias células conidiogênicas, onde se originam conídios geralmente ovais, com distribuição lateral ou apical. O tipo fialófora apresenta célula conidiogênica denominada fiálide, em forma de ânfora ou frasco, que ocorre ao longo ou na porção terminal do micélio; os conídios, pequenos e ovais, podem se acumular na extremidade da fiálide (DIXON; POLAK-WYSS, 1991; LARONE, 1989; MCGINNINS, 1980; MCGINNIS; SCHELL, 1980; SCHELL et al, 1999).

Fonsecaea compacta apresenta hifas marrom-claro e esporulação predominante cladosporium. Os tipos rinocladiella e fialofora também estão presentes, mas em menor número.

Cladophialophora (Cladosporium) spp mostram conidiação aerógena observando-se conídios em cadeia, tipo cladosporium (SCHELL et al, 1999).

Phialophora verrucosa apresentam frutificação apenas do tipo fialófora (SCHELL et al, 1999).

Rhinocladiella mostra frutificação apenas do tipo rinocladiella (SCHELL et al, 1999).

Tratamento da cromoblastomicose: atualidades e perspectivas.

A cromoblastomicose constitui um desafio terapêutico enfrentado pelo médico e o paciente. Ao longo da história do conhecimento dessa micose, diversos foram os métodos e as substâncias empregadas para tratamento e muitos os fracassos.

Nos estágios iniciais da doença, alguns autores indicam eletrocoagulação, curetagem e exérese das lesões, mas outros pesquisadores contestam o uso desses procedimentos considerando que ao invés de promover a cura causam uma disseminação da doença, com agravamento progressivo do quadro clínico e causando, muitas vezes, sérios prejuízos a saúde dos pacientes (CASTRO, 1998; LACAZ et al, 1991).

Uma das primeiras tentativas para o tratamento foi a administração de iodeto de potássio, por via oral, e iodeto de sódio a 10 %, por via venosa, como terapêutica suplementar. Bons resultados foram obtidos por Bopp, em 1957, utilizando essas medicações associadas. Outras preparações a base de ouro, bismuto, arsênio, mercúrio ou azul de metileno, foram também utilizadas para tratar essa micose, com diversos graus de sucesso terapêutico (LACAZ et al, 1991).

Entre os antimicóticos poliênicos, a anfotericina B, administrada por diferentes vias, foi utilizada por alguns pesquisadores com algum sucesso (CUEVA-PAZ, 1969). Entretanto, além da toxicidade e das dificuldades envolvidas na administração desse fármaco, observou-se a ocorrência de resistência com o uso prolongado do mesmo (LOPES et al, 1978). Durante

vários anos, a anfotericina B foi utilizada em combinação com a 5-fluorocitosina (BOPP, 1976; BOPP, 1978). Embora tenha sido referida a obtenção de bons resultados com essa associação no tratamento da cromoblastomicose, fatores indesejáveis, que também envolvem a monoterapia com esses agentes, limitaram o uso da terapia combinada (LOPES et al, 1978a; LOPES et al, 1978b; LOPES et al, 1973; LOPES et al, 1979; RESENDE et al, 1973).

Na década de 1980, o cetoconazol que é um derivado azólico foi indicado por diversos autores devido a melhora clínica e a menor toxicidade, em comparação com a anfotericina B, promovidas por esse derivado azólico no tratamento da micose em questão (MCBURNEY, 1982; MITTAG; KREYSEL, 1982). No entanto, em monoterapia ou associado a 5-fluorocitosina, o uso prolongado de cetoconazol não impediu a ocorrência de recidivas da doença. (DE CLERCQ et al, 1985).

Em 1987 foi relatada a obtenção de bons resultados clínicos em dois pacientes com cromoblastomicose tratados com itraconazol, um azol de segunda geração (GARNER et al, 1987). Desde então, vários autores comprovaram a eficácia desse tratamento (BORELLI, 1987; KUMAR et al, 1991; YU, 1995), porém outros não obtiveram o mesmo sucesso (CASTRO, 1992; RESTREPO, 1994). Melhores resultados foram obtidos associando-se a administração de itraconazol com crioterapia, de tal modo que, em alguns casos, foram comprovadas cura clínica e micológica mediante acompanhamento prolongado (BONIFAZ et al, 1997; POIRRIEZ et al, 2000; KULLAVANIJAYA; ROJANAVANICH, 1995).

Outros azóis já foram também empregados no tratamento da cromoblastomicose, mas sucesso terapêutico foi alcançado em poucos casos (DIAZ et al, 1992; FRANCO et al, 1992; POIRRIEZ, 2000; YU; GAO, 1994).

Os estudos com terbinafina, uma alilamina, embora mais recentes e menos numerosos que os realizados com outros antimicóticos, mostraram bons resultados no tratamento dessa micose (ESTERRE et al, 1996b; ESTERRE et al, 1997). Esses achados requerem, porém, pesquisas mais amplas, a fim de se comprovar a eficácia dessa terapia após alguns anos de suspensão da mesma.

Pelo exposto, verifica-se que ainda não existe um tratamento padrão, mundialmente aceito para a cura ou, ao menos, para um controle eficaz da cromoblastomicose. A falha do sucesso terapêutico pode estar relacionada tanto à resistência microbiológica quanto à resistência clínica ao quimioterápico em questão (BORELLI, 1987; RESTREPO et al, 1988; FINQUELIECH et al, 2000). A demonstração da primeira pode ser relativamente simples, por meio de provas de sensibilidade *in vitro* ou da identificação do agente causador (MARCO et al, 1998), mas a comprovação da segunda é mais complexa, por que está associada a baixos níveis de droga no soro e ou nos tecidos, condições físicas e sociais do hospedeiro, interações medicamentosas e o estado imunológico do paciente (ESPINEL-INGROFF et al, 2000; GUPTA et al, 2002).

De modo geral, quando os portadores de cromoblastomicose procuram o serviço médico, a doença já apresenta um quadro bastante

evoluído, com lesões extensas, comprometendo, às vezes, todo o membro atingido. Nessas condições, os níveis de antifúngicos nos tecidos envolvidos podem ser muito baixos (MARCO et al, 1998; ESPINEL-INGROFF, 1998) ou inadequados para impedir o desenvolvimento do agente causador.

PROPRIEDADES GERAIS DE ALGUNS ANTIFÚNGICOS

1-ANFOTERICINA B (AnB)

Aspectos químicos

A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo, derivado de *Streptomyces nodosus*, isolado por Gold et al em 1956. Esse composto é caracterizado por um anel de átomos de carbono que apresenta uma região hidrofílica, contendo várias hidroxilas, e outra lipofílica, com uma sequência de quatro duplas ligações conjugadas. A anfotericina B é praticamente insolúvel em água, fotossensível e termossensível. Apresenta atividade antifúngica em pH 6 a 7.5 (DOLLERY, 1991a).

Mecanismo de ação

De modo geral, a AnB é, ainda hoje, o fármaco de escolha para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Dependendo da dose, esse poliênico possui ação fungistática ou fungicida. Atua interferindo na permeabilidade da membrana plasmática, mas os efeitos antifúngicos inicialmente dependem de sua ligação ao esterol da membrana. Essa ligação pode resultar na perda de íons intracelulares, o que caracteriza a natureza fungistática da droga. Nesse caso, o efeito pode ser revertido mediante remoção do fármaco. Em concentrações fungicidas, pode determinar a formação de poros na membrana com conseqüente perda de constituintes celulares de baixo peso molecular; essa condição é irreversível

e causa falência celular (BODY, 1988; BRAJTBURG et al, 1990). A ação fungicida da AnB decorre da alteração da membrana celular, mas também de danos oxidativos causados à célula fúngica (BRAJTBURG et al, 1990; SOKOL-ANDERSON et al, 1986; SOKOL-ANDERSON et al, 1988). Esse poliênico possui a capacidade de aumentar o número de células produtoras de anticorpos nos gânglios linfáticos e no baço. Tal atividade induz a estimulação do sistema imune do hospedeiro, aumentando a potenciação do IgG e pode estar estimulando as reações de atividades tardias (BRALTBURG et al, 1990). A AnB também interage com o colesterol da membrana dos mamíferos, causando reações de toxicidade.

Espectro de ação

A AnB possui um largo espectro de ação (GUPTA, 1994a). Tem atividade contra a maioria dos fungos de importância médica e é eficaz no tratamento de mucormicose, hialo-hifomicose e feo-hifomicose, mas não demonstra boa atividade contra *Pseudallescheria boydii* e na tricosporonose (BRALTBURG et al, 1990).

Uso terapêutico

A anfotericina B pode ser encontrada sob as formas de pastilhas, comprimidos e suspensão para uso oral, indicadas no tratamento de candidíase bucal, orofaríngea e esofágica (DOLLERY, 1991a). Também para uso tópico, é encontrada sob as formas de creme e adesivo contendo

3% do poliênico. Para administração parenteral, a AnB pode ser utilizada como solução tradicional (Fungizon ®) ou preparação lipossomal (Ambisome ®), requerendo internação hospitalar .

A AnB é o tratamento de escolha para a aspergilose invasiva, esporotricose cutânea, criptococose, fusariose, alternariose, tricosporonose e penicililose marnefei (ARBERNATHY, 1973; DOLLERY, 1991a). Apesar de os imidazóis ou os triazóis serem utilidade em muitos pacientes com blastomicose, histoplasmoses, coccidioidomicose e paracoccidioidomicose, a AnB é o fármaco de escolha para essas micoses principalmente em pacientes imunossuprimidos (PRESTERL; GRANINGER, 1998). A AnB é eficaz, também, em pacientes com neutropenia profunda e febre, que não respondem a agentes antibacterianos de amplo espectro (GIMENIA et al, 1996).

Interações medicamentosas

Os efeitos nefrotóxicos da AnB são intensificados em presença de aminoglicosídeo e ciclosporina e a perda de potássio pode ser intensificada em interações com corticóides (CARLSON; CONDON, 1994; DOLLERY, 1991a).

Associações desse poliênico com a 5-fluorocitosina podem ser sinérgicas (BENNETT, 1996; LOPES et al, 1979; POIRRIEZ et al, 2000), mas antagônicas com o cetoconazol (GUPTA et al, 1994). Entretanto, ao contrário desse imidazol, a terapia combinada com voriconazol, um triazol de

terceira geração, tem sido sugerida como tratamento primário para a aspergilose invasiva, uma micose considerada de difícil tratamento (WILDFEUER et al, 1998).

Toxicidade

O uso parenteral da formulação tradicional da AnB pode ser acompanhado de importantes efeitos colaterais, sobretudo o comprometimento da função renal, um fator limitante do uso prolongado da AnB (CARLSON; CONDON, 1994; DOLLERY, 1991).

Embora existam esquemas terapêuticos elaborados para minimizar esses efeitos, o tratamento pode ser menos agressivo quando o diagnóstico é precoce. A administração de preparações lipossomais, formuladas para reduzir a toxicidade da anfotericina B, mesmo em doses elevadas, envolve custos maiores que os da formulação tradicional e também podem causar importantes reações adversas (DE MARIE et al, 1994; HIEMENZ ; WALSH, 1996 PRESTERL ; GRANINGER, 1998).

Preparações tópicas e orais de AnB não são consideradas tóxicas para o paciente (FIELDING et al, 1992).

Farmacocinética

A via e a dose de administração da AnB variam de paciente para paciente e também dependem da natureza e extensão da infecção .

Esse fármaco não é absorvido pela pele ou mucosa e sua absorção é insignificante no trato gastrintestinal (DOLLERY, 1991a).

A aplicação endovenosa deve ser iniciada em pequenas doses, gradualmente aumentadas para tentar reduzir os efeitos tóxicos. Administrando-se primeiro 25mg, obtém-se níveis séricos entre 0,2µg/ml e 0,5µg/ml, mantidos por 10 horas. Em seguida, a ministração de 50mg pode alcançar níveis séricos de 1,0µg/ml a 2,0µg/ml em uma hora (BENNETT, 1996; DOLLERY, 1991a; RICHARDSON; WARNOCK, 1993). A AnB lipossomal pode atingir níveis de 20µg/ml, quando ministrados 3mg/kg, em intervalos de 24 horas (LEENDERS et al, 1998). As vias de eliminação da AnB são pouco conhecidas; apenas 3% da dose diária é excretada na urina após tratamento prolongado (DOLLERY, 1991a). A meia vida plasmática é de 24 a 48 horas, seguindo-se uma segunda etapa de eliminação após 15 dias da ministração. A preparação lipossomal tem meia vida menor, variando de 0,4 a 0,8 horas, e a segunda etapa de eliminação é de 26 a 36 horas (LEENDERS et al, 1998).

A dose administrada gradualmente é utilizada no tratamento de pacientes imunocompetentes, com função renal normal, em quatro horas de infusão. Para pacientes com coccidioidomicose, a administração intratecal de AnB pode ser indicada, em doses de 0,25mg (DRUTZ, 1992).

Reações adversas

Os efeitos colaterais variam de paciente para paciente, mas estão presentes principalmente nas primeiras semanas de tratamento. Incluem febre seguida de calafrios, náusea, vômitos, dispnéia e hipotensão (DOLLERY, 1991a). O efeito mais preocupante é a disfunção renal, sobretudo em pacientes em tratamento prolongado, e o dano pode ser permanente devido à dose cumulativa. O dano renal pode ser evitado pela monitorização durante o tratamento (BENNETT, 1996; CARLSON; CONDON, 1994; KENNEDY et al, 1983).

Resistência

Mesmo após quase 50 anos de disponibilidade da anfotericina B, o relato de um número relativamente baixo de casos de resistência a esse antifúngico tornou-a droga de escolha para o tratamento da maioria das micoses invasivas.

É possível que a carência de rotineiros fungigramas para avaliar a sensibilidade de cepas isoladas, assim como a falta de uma ótima correlação dos testes de sensibilidade disponíveis com a resposta clínica, na maioria dos casos, tenha contribuído para a falsa impressão de que determinados fungos, como as leveduras, são sempre sensíveis à anfotericina B (BENNETT, 1996). Verificou-se, porém, que um grupo de pacientes imunocomprometidos, tratados com esse fármaco, evoluíram para óbito,

embora as cepas de *Candida* spp isoladas a partir dos mesmos tivessem sido consideradas sensíveis às concentrações de AnB inferiores às alcançadas no soro (ESPINEL-INGROFF, 1997). Para esses casos, o mecanismo de resistência proposto foi a ocorrência de alteração nos lipídeos, sobretudo no ergosterol da membrana fúngica, induzida pelo poliênico (WHITE et al, 1998)

Baixa concentração ou ausência de ergosterol tem sido considerada como causa de resistência intrínseca de fungos demáceos, como *Fonsecaea pedrosoi* e *Madurella grisea*, a AnB. Entretanto, em outros fungos, como *Fusarium* spp e *Aspergillus fumigatus*, que também apresentam tal resistência, a concentração de ergosterol é considerada normal (VANDEN BOSSCHE et al, 1994). Com base na sensibilidade de protoplastos à anfotericina B, sugeriu-se que o poliênico é incapaz de penetrar a parede celular de algumas dessas espécies fúngicas (BENNETT, 1996).

Estudos relacionados a mecanismos moleculares de resistência *in vitro*, mostraram que cepas mutantes resistentes à anfotericina B substituem o ergosterol por determinados esteróis precursores, porém não está esclarecido se os mutantes com deficiência de ergosterol apresentam ou não patogenicidade suficiente para sobreviver em tecidos profundos (BENNETT, 1996).

2- 5-FLUOROCITOSINA (5-FC)

Aspectos químicos

A 5-fluorocitosina é um derivado pirimidínico, obtido por síntese, quimicamente definido como pirimidina fluorada, relacionado ao fluorouracil e a floxuridina. É solúvel em água, pouco solúvel em álcool e insolúvel em clorofórmio e éter. A solução para infusão venosa deve ser armazenada entre 18 e 25°C. Em temperaturas baixas pode haver precipitação e em altas temperaturas ocorre a decomposição em fluorouracil (BENNETT, 1996; DOLLERY, 1991b).

Mecanismo de ação

A atividade antifúngica da 5-FC decorre da inibição da síntese de ácidos nucleicos pela célula fúngica. Nesta, a 5- fluorocitosina é convertida em 5-fluorouracil pela enzima citosina desaminase. O produto formado é convertido a ácido 5-fluorouridílico a partir do qual ocorre a síntese da 5-fluoridinatrifosfato. Esta se liga ao RNA levando à síntese de proteínas anômalas. As células dos mamíferos não conseguem converter a 5-fluorocitosina em fluorouracil, o que mostra a especificidade da droga para células fúngicas (BENNETT, 1996; DOLLERY, 1991b).

Espectro de ação

A 5-FC é ativa contra *Cryptococcus neoformans*, algumas espécies de *Candida*, como *Candida glabrata*, e agentes da cromoblastomicose (BLOCK et al, 1973, LOPES et al, 1965; CAMPOS MAGALHÃES; MEYER, 1992). Foi a droga de eleição em monoterapia contra cromoblastomicose, porém o uso prolongado proporcionou aparecimento de resistência LOPES et al, 1979; LOPES et al, 1978b; UITTO et al, 1979). Sua associação com AnB foi considerada até pouco tempo como tratamento de escolha para cromoblastomicose. Essa combinação mostrou-se vantajosa em relação a monoterapia com 5-FC, dificultando o surgimento de resistência. Muitos autores descrevem essa associação como sinérgica, e trabalhos *in vivo* e *in vitro*, realizados com cepas de *Fonsecaea pedrosoi*, comprovaram sinergia (POIRRIEZ et al, 2000).

Na década de 70, a administração oral da associação de 5FC com tiabendazol, uma droga anti-helmíntica, apresentou resultados satisfatórios, porém esta combinação não foi mais amplamente estudada (BLANK ; REBELL, 1965).

Toxicidade

Existem alguns relatos de efeitos colaterais, como distúrbios gastrintestinais, hepáticos e na função da medula óssea. Foram observadas embriotoxicidades e propriedades teratogênicas da 5-FC em estudos com

ratos, porém essa droga não é considerada mutagênica (BENNETT, 1996; DOLLERY, 1991b).

Farmacocinética

Em pacientes normais a absorção desse antifúngico é rápida quando administrada por via oral. Após duas horas de administração de uma dose de 2g, obtém-se picos séricos de quase 30µg/ml. Em pacientes com criptococose esses picos alcançam cerca de 48,5 µg/ml após uma a duas horas da administração. Em pacientes com função renal comprometida, o nível máximo pode levar até dez horas para ser atingido. Cerca de 80% da dose é excretada na urina, sem modificações, em concentrações variáveis. A meia vida plasmática é de 3 a 6 horas (BENNETT, 1996; DOLLERY, 1991b).

Uso terapêutico

No Brasil, as formulações de 5-FC não se encontram disponíveis. Na Europa é encontrada sob a forma de comprimidos contendo 500mg, e nos Estados Unidos na forma de cápsulas com 250mg e 500mg. Embalagens contendo 10mg/ml, para infusão venosa, podem ser encontradas em várias partes do mundo (BENNETT, 1996).

Para o tratamento de candidíase disseminada e de criptococose as doses de 5-FC variam de 100 a 200mg/kg (BENNETT, 1996; DOLLERY, 1991b). Entretanto, podem ser obtidos resultados mais favoráveis quando a

5-FC é combinada com outras drogas antifúngicas, sobretudo com a AnB ou com o itraconazol. Essas combinações são utilizadas para evitar o desenvolvimento de resistência (BOLZINGER et al, 1991; MARQUES et al, 1947, POIRRIEZ et al, 2000).

Reações adversas

Não se observam efeitos colaterais graves durante ou após o tratamento com 5-FC. Relatos de náuseas, vômitos, diarreias, sonolência, vertigens e prurido, têm sido descritos. A toxicidade é mais explícita em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida devido à necessidade de administração de altas doses (BENNETT, 1996; DOLLERY, 1991b).

Interações medicamentosas

Associações entre 5-FC e AnB apresentam ação sinérgica (KOBAYASHI; MEDOFF, 1977; MEDOFF et al, 1971; MONTGOMERIE et al, 1975; SHADOMY et al, 1991), cujo mecanismo envolve a ação da AnB sobre a permeabilidade da membrana plasmática, facilitando a penetração e a ação da 5-FC. Esta associação tem a vantagem de evitar o aparecimento de cepas resistentes e de reduzir os efeitos colaterais de ambas as drogas (BENNETT, 1996; DOLLERY, 1991b). Também existem relatos de resultados satisfatórios obtidos com associações entre 5-FC e itraconazol, e

mesmo com mais de uma droga. A associação de AnB, 5-FC e fluconazol, mostram efeito inibitório aditivo para *Candida albicans* e *C. neoformans* (CURRIE et al, 1995; SANGEORZAN et al, 1994).

Resistência

A monoterapia com 5-FC no tratamento de candidíase e criptococose demonstra claramente o fracasso terapêutico, devido ao surgimento de resistência secundária (DOLLERY, 1991b). O mecanismo de resistência pode estar relacionado com a deficiência, ausência ou excesso de componentes que atuam na síntese protéica. A resistência secundária é relatada em casos de cromoblastomicose com recrudescimento das lesões após uma resposta inicial (LOPES et al, 1978a).

Algumas espécies de *Candida* apresentam resistência inata a 5-FC (VANDEN BOSSCHE et al, 1998).

3-TERBINAFINA

Aspectos químicos

A terbinafina é agente antifúngico da classe das alilaminas e apresenta ação fungicida *in vitro*. É um produto de síntese de hidrocloreto, solúvel em água e álcool (DOLLERY, 1992c).

Mecanismo de ação

Atua principalmente na biossíntese do ergosterol. Liga-se a enzima esqualeno epoxidase, promovendo a redução de ergosterol e acúmulo de esqualeno nas células fúngicas (DOLLREY, 1992e; RYDER, 1985, RYDER, 1992). Estudos realizados com *Candida* e *Trichophyton* não demonstraram ação direta da droga em proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes celulares. Não atua no sistema do citocromo P-450.

A terbinafina pode apresentar ação fungistática ou fungicida. Em fungos filamentosos esses mecanismos ainda não estão bem esclarecidos, mas sabe-se que seu efeito fungistático está relacionado a síntese de esterol e o efeito fungicida é proporcionado principalmente pelo acúmulo de esqualeno, o que promove a destruição da membrana celular (DOLLREY, 1992; RYDER, 1985).

O efeito fungicida da terbinafina também pode estar relacionado a uma redução nos níveis de ergosterol, um componente essencial da célula fúngica, o que provavelmente alteraria a integridade e a falência da mesma (DOLLREY, 1992c; RYDER, 1985).

Espectro de ação

A terbinafina é usada no tratamento de infecções fúngicas da pele, cabelos e pêlos causadas por dermatófitos. Alguns estudos *in vitro* mostram

que esse fármaco também pode proporcionar resultados satisfatórios contra fungos dimórficos e alguns demácios (JESSUP et al , 2000; RYDER, 1999).

Também atua contra infecções causadas por leveduras, como *Malassezia furfur*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*. Entretanto, para algumas espécies de *Candida* como *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, sua atividade é menos eficaz (DOLLERY, 1992c; GUPTA et al, 1994b; JESSUP et al, 2000; RYDER, 1999).

Considerada como antifúngico de amplo espectro de ação, a terbinafina mostra-se ativa contra patógenos fúngicos importantes, incluindo *Blastomyces dermatitides*, *Histoplasma capsulatum* e *Sporothrix schenckii*, assim como agentes da cromoblastomicose e feo-hifomicose (DOLLERY, 1992; MCGINNIS ; PASSARELL, 1998; JESSUP et al, 2000; RYDER, 1999).

Farmacocinética

A terbinafina possui propriedades lipofílicas, possibilitando ligações com proteínas plasmáticas, principalmente albumina e frações lipoproteicas. A droga é extensamente distribuída pelo corpo, com maior afinidade por tecidos adiposos. Durante a administração oral ocorre acúmulo de altas concentrações no extrato córneo, couro cabeludo e cabelo. A concentração plasmática é atingida após duas horas da ingestão. Doses usuais de 250mg e 500mg resultam em concentrações aproximadas de 0,9µg/ml a 2,0µg/ml (GUPTA, 1994b; BENNETT, 1996). É eliminada na urina e nas fezes (DOLLERY, 1992c; RYDE, 1992; GUPTA, 1994b).

Uso terapêutico

A terbinafina pode ser encontrada sob a forma de creme, contendo 1% da droga, para uso tópico e de comprimidos, com 125mg ou 250mg para uso oral. A dose administrada depende do tipo e extensão da lesão. Cerca de 80% da dose oral é absorvida no trato gastrointestinal. O pico plasmático, alcançado após duas horas, é de 0,9µg/ml a 2,0µg/ml, com doses usuais de 250µg/ml a 500µg/ml. Níveis estáveis são atingidos entre 10 e 14 dias após início do tratamento. No tratamento tópico com terbinafina, os níveis plasmáticos encontrados são muitos baixos e não alteram a integridade da estrutura córnea (DOLLEY, 1992c; GUPTA et al, 1994b; GUPTA, 1997).

Reações adversas

Os efeitos colaterais provocados pelo uso da terbinafina podem ser percebidos nas primeiras dosagens. Os mais freqüentes são distúrbios gastrointestinais e sintomas cutâneos. Sintomas com uso da terbinafina tópica manifestam-se na forma de eczema, urticária, eritema e prurido (DOLLEY, 1992c; GUPTA et al, 1994b; GUPTA, 1997).

Interação medicamentosa

A terbinafina não atua no metabolismo da enzima citocromo P-450, o que impede sua interferência no metabolismo de outras drogas. Entretanto,

drogas que atuam no metabolismo do citocromo P-450 podem alterar o catabolismo da terbinafina. A cimitidina em altas doses não deve ser administrada juntamente com a terbinafina, pois a primeira droga proporciona aumento na eliminação da terbinafina (DOLLERY, 1992c).

Resistência

Ainda não existem relatos na literatura de resistência a terbinafina. Observou-se, porém, que em *Candida glabrata* ocorreu resistência cruzada da terbinafina com fluconazol (VANDEN BOSSCHE, 1997).

4-CETOCONAZOL

Aspectos químicos

Os compostos azólicos são formados por um anel nitrogenado, de cinco membros, unido a outro anel aromático por meio de ligação carbononitrogênio. O cetoconazol contém dois átomos de nitrogênio no anel azólico. É insolúvel em água, pouco solúvel em álcool, solúvel em metil-álcool (BENNETT, 1996, BENNETT, 1995).

Mecanismo de ação

Atua na inibição da biossíntese do ergosterol ligando-se a citocromo P-450. Para ativar o citocromo é necessário que ocorra a desmetilação da enzima lanosterol-14-alfa-metil-esterol. O cetoconazol liga-se ao cofator heme da citocromo P-450 por meio do N₃ interferindo na ligação desta enzima. O acúmulo desta enzima altera o arranjo das cadeias acíclicas dos fosfolipídeos e os sistemas enzimáticos da membrana. Em consequência, as alterações nas atividades de ATPase e das enzimas que transportam os elétrons, favorecem a inibição do desenvolvimento do fungo (SAAG; DISMUKES, 1988). Ação fungistática do cetoconazol é menor quando comparada a outros imidazóis (clotrimazol e miconazol) sendo necessárias altas doses para conseguir esta ação (BENNETT, 1995).

O cetoconazol inibe a biossíntese de esteróides em humanos, da mesma forma que em fungos, mediante a inibição dos sistemas enzimáticos dependentes da citocromo P-450, o que pode determinar diversas anormalidades endócrinas (BENNETT, 1996).

Espectro de ação

Os anos 80 foram marcados pela introdução do cetoconazol. Este possui ação antifúngica de amplo espectro e apresenta menor toxicidade que a anfotericina B. Atua contra micoses sistêmicas causadas por várias espécies de *Candida*, infecções por dermatófitos, é ativa contra pitiríase

versicolor. Agentes de micoses subcutâneas e de aspergiloses não respondem ao antifúngico e agentes da criptococose são moderadamente sensíveis (GUPTA et al, 1994a).

Alguns autores consideram que a associação de cetoconazol com 5-FC apresenta baixa eficácia terapêutica no tratamento da cromoblastomicose (TURFANELLI ; MILBURN, 1990).

Toxicidade

O cetoconazol pode causar hepatotoxicidade humana e interferir na esteroidogênese humana. Em estudo com animais em tratamento prolongado com cetoconazol, foram detectadas alterações de enzimas hepáticas e interferência na fertilidade desses animais (DOLLERY, 1991c).

Farmacocinética

Após ingestão de uma dose de 200mg, os picos plasmáticos são obtidos dentro de uma a duas horas, correspondendo a aproximadamente 3,5µg/ml. Administrações orais de 200mg, 400mg e 800mg, alcançam máximos de concentrações plasmáticas de quase 8µg e 20µg/ml. Quando é administrada dose de 800mg, a meia vida chega a atingir 8 horas (RICHADSON ; WARNOCK, 1993). O cetoconazol necessita de meio ácido no estômago para haver um grau de absorção satisfatório. Deve-se evitar a administração concomitante de drogas que diminuem a secreção gástrica,

tais como antiácidos, anticolinérgicos e bloqueadores de receptores H₂ (cimetidina e outros) (DOLLERY, 1991c). O cetoconazol não penetra adequadamente no sistema nervoso central, o que o torna contra indicado no tratamento de meningite (RICHADSON ; WARNOCK, 1993). Com dose de 200mg de cetoconazol pode-se observar uma diminuição transitória dos níveis de testosterona. Estes níveis se normalizam dentro de 24 horas após suspender a administração de cetoconazol. Sua eliminação é bifásica. A droga ingerida é excretada pela bile no trato gastrointestinal, nas fezes e na urina (BENNETT, 1995; DOLLERY, 1991c).

Uso terapêutico

O cetoconazol apresenta amplo espectro de ação nas micoses superficiais e profundas. Atua nas infecções de pele, couro cabeludo e unhas causadas por dermatófitos ou leveduras e nas infecções bucais e do trato gastrointestinal causadas por leveduras (candidíase oral, esofagite moniliásica e outras). É largamente utilizado no tratamento de candidíase vaginal, principalmente nas formas agudas e crônicas recidivantes. Atua nas infecções micóticas sistêmicas, tais como paracoccidioidomicose e histoplasmose. Já foi utilizado no tratamento profilático de micoses em pacientes imunodeprimidos, como portadores de neoplasias, receptores de órgãos, pacientes queimados e os tratados com imunodepressores (BENNET, 1996; DOLLERY, 1991c).

Reações adversas

O cetoconazol é geralmente bem tolerado. Os efeitos colaterais relatados foram transitórios e de intensidade leve. Os efeitos colaterais mais freqüentes foram náuseas e vômitos, seguidos de prurido e dor abdominal. Raramente foram registrados dor de cabeça, tontura, sonolência, febre, calafrios e diarreia (DOLLERY, 1991c).

Em casos raros foram observadas disfunções hepatocelulares de origem desconhecida, geralmente após algumas semanas de tratamento. Quando ocorrem alterações na prova de função hepática, associadas a quadro compatível com hepatite, o tratamento deve ser interrompido. A hepatite sintomática induzida pelo fármaco é rara, mas pode ser fatal (DOLLERY, 1991c).

Diversas anormalidades endócrinas podem ser evidenciadas, pois o cetoconazol inibe a biossíntese de esteróides em humanos, da mesma forma que nos fungos, mediante uma inibição dos sistemas enzimáticos dependentes da citocromo P-450. Doses baixas de cetoconazol são capazes de gerar uma queda passageira nas concentrações plasmáticas de testosterona e de estradiol. Em altas doses, foi registrada azoospermia, porém a esterilidade não é permanente. Em algumas mulheres, o cetoconazol pode causar irregularidades menstruais e em alguns homens causar ginecomastia e redução do líbido e da potência. É prudente suspender o seu uso antes de procedimentos cirúrgicos de grande porte e evitar a utilização de altas doses em casos de traumatismo, queimaduras

graves ou outras condições estressantes. O cetoconazol é teratogênico em animais (DOLLERY, 1991c; GUPTA et al, 1994 a).

Interações medicamentosas

Antiácidos, anticolinérgicos bloqueadores de receptores H_2 que diminuem a secreção gástrica podem reduzir a absorção do cetoconazol. Não deve ser administrado com rifampicina, pois ocorre uma redução sanguínea (GUPTA et al, 1994b).

Para pacientes tratados com griseofulvina, recomenda-se manter um período de aproximadamente um mês após a interrupção desse tratamento, devido ao alto potencial hepatotóxico da griseofulvina, antes do início da administração de cetoconazol. O cetoconazol pode antagonizar a ação da anfotericina B (DOLLERY, 1991c).

Resistência

Candida krusei e os agentes da mucormicose parecem ser resistentes ao cetoconazol. Fatores como redução na concentração intracelular dos azóis, excessiva produção e alteração de 14-alfa demetilase e mutação concomitante na C5-6 denaturase, foram implicados como elementos que contribuem para a resistência aos azóis. Resistência cruzada é comumente observada com o uso do cetoconazol (VANDEN BOSSCHE et al, 1998). Em

casos de candidíase vulvovaginal tratados com cetoconazol foram relatadas falhas terapêuticas (VANDEN BOSSCHE et al, 1994).

5-ITRACONAZOL (ITZ)

Aspectos químicos

O itraconazol é uma triazol queratinofílico, lipofílico, insolúvel em água, pouco solúvel em álcool e solúvel em dimetilsulfóxido. Apresenta anel triazólico que lhe confere amplo espectro de ação. Este triazol está intimamente relacionado ao cetoconazol (DOLLERY, 1992b)

Mecanismo de ação

Os dois principais triazóis sintetizados na década de 1980, são o itraconazol e o fluconazol. O itraconazol atua na inibição da síntese do ergosterol, mediante ligação com a enzima 24-metileno-di-hidro-lanosterol (MCGININS; PASSARELL, 1998). Inibindo a enzima do fungo, o itraconazol causa alteração na permeabilidade e na atividade funcional da membrana, interferindo no transporte de nutrientes e reduzindo a ATPase. Alteração na membrana lhe confere uma ação primária fungistática (DE MURI; HOSTETTER, 1995). Tanto o itraconazol como o fluconazol tem uma afinidade pela enzima P-450 do fungo, um componente encontrado nas

células dos mamíferos. Estes antifúngicos possuem mecanismo de ação semelhante ao do cetoconazol, no entanto, o aumento de um átomo de nitrogênio no anel azóico, confere maior seletividade no sítio de ação, causando menor efeito nas outras reações mediadas pelo citocromo P-450 (MCGININS; PASSARELL, 1998). Nos imidazóis essa interferência é feita pelo N₃ e nos triazóis pelo N₄ (SAAG; DISMUKES, 1998). O aumento de um nitrogênio não só proporciona aumento da seletividade, mas também garante uma maior estabilidade metabólica e o tempo de meia vida plasmática é prolongado (BENNETT, 1995). O itraconazol apresenta maior afinidade contra fungos filamentosos (MCGINNI; PASSARELL, 1998).

Espectro de ação

O itraconazol apresenta boa atividade em casos de dermatofitoses, onicomicoses, micoses subcutâneas e micoses sistêmicas. Apresenta ação fungistática em baixas concentrações. Estudos *in vitro* realizados com cepas de *Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, fungos dimórficos e causadores feo-hifomicose de eumicetomas demonstraram elevada sensibilidade dessas cepas ao itraconazol (DOLLERY, 1992b; SAAG ; DISMUKES, 1988).

Alguns autores destacam a eficácia terapêutica apresentada pelo itraconazol nos casos de cromoblastomicose (BORELLI, 1987; LAVALLE et al, 1987). Além de proporcionar cura clínica e micológica nas formas menos disseminadas, proporciona uma significativa redução de lesões graves. A

combinação do itraconazol com 5-FC, associada ou não a criocirurgia, tem sido apontada como uma alternativa de tratamento para pacientes com cromoblastomicose (CASTRO, 1998).

Toxicidade

Dependendo da dose, a toxicidade do itraconazol pode ser evidenciada quando administrada a mulheres grávidas. Estudo feito em ratas grávidas, utilizando-se dose diária de 40 e 160mg/kg, mostraram ocorrência de toxicidade materna, embriotoxicidade e, principalmente, mal formações ósseas (DOLLERY, 1992b).

Farmacocinética

Os níveis sanguíneos de itraconazol variam de paciente para paciente. Esses níveis muito reduzidos em pacientes em jejum, naqueles com redução gástrica e em imunodeprimidos em estágios avançados. Sua absorção é alta; mais de 90% da dose administrada é encontrada no plasma (LAVALLE et al, 1987). É metabolizado no fígado. São atingidos níveis de equilíbrio dinâmico após alguns dias. Após administração de 100mg diários, durante 15 dias, o pico sérico é de 0,5µg/ml. Sua meia vida é de cerca de 30 horas (DOLLERY, 1992b)

Uso terapêutico

O itraconazol é comercializado na forma de cápsulas de 100mg. A dose usual é de 200mg, uma ou duas vezes ao dia. A dose pode ser aumentada conforme o grau de infecção ou do estado geral do paciente.

Esse azol substituiu o cetoconazol no tratamento de histoplasmose. Pacientes com AIDS e com histoplasmose disseminada, estabilizada mediante terapia com AnB, tem se utilizado itraconazol como terapia de manutenção. São encontrados resultados favoráveis no tratamento de aspergilose invasiva e feo-hifomicose (SZEKELY et al, 1999). O fármaco pode ser usado no tratamento da candidíase orofaríngea, esofágica ou vaginal, assim como no tratamento de onicomicose, dermatomicoses resistentes a griseofulvina e da *tinea versicolor*.

Trabalhos recentes utilizando o itraconazol em casos de cromoblastomicose, apresentaram resultados favoráveis (PFALLER et al, 2000; VIVAS; TORRES-RODRIGUES, 2001). Pacientes com esporotricose sensíveis aos iodetos têm sido tratados com sucesso com itraconazol.

Efeitos indesejáveis

Os efeitos colaterais estão diretamente relacionados a dose administrada. Foram registrados náuseas, vômitos, hipocalcemia, aumento das aminotransferases, erupções cutâneas e, ocasionalmente, hepatotoxicidade. Altas doses podem favorecer insuficiência supra-renal,

edema das extremidades inferiores e hipertensão (BENNETT, 1996; DOLLERY, 1992b).

Interações medicamentosas

Drogas que proporcionam acidez gástrica, como antagonista H₂, bloqueadores de bomba de prótons e terapias com rifampicina, fenitoína e carbamazepina não devem ser associadas ao itraconazol, pois estas drogas reduzem as concentrações de itraconazol. Também a associação com didanosina deve ser evitada, porque a didanosina é formulada com tampões que neutralizam o ácido gástrico. O itraconazol eleva as concentrações plasmáticas de fármacos metabolizados pela enzima CYP3A4 da citocromo P-450, incluindo a digoxina, a ciclosporina e a fenitoína. O itraconazol também eleva os níveis de terfenadina e fenitoína (BENNETT, 1996; DOLLERY, 1992b).

Resistência

Alguns isolados de *Candida albicans* que sofreram mutação no P-450 têm demonstrado resistência ao itraconazol. Após o uso primário de cetoconazol foi observada resistência cruzada com fluconazol (VANDEN BOSSCHE, 1997).

6- FLUCONAZOL

O fluconazol é um triazol composto por três átomos de nitrogênio no anel azóico. É um bistriazol fluorado, obtido por síntese. Apresenta-se como pó cristalino branco, solúvel em água e insolúvel em álcool (BENNET, 1996; DOLLERY, 1991a; GUPTA et al, 1994 a).

Mecanismo de ação

Assim como os imidazóis, o fluconazol atua inibindo a síntese do ergosterol, porém sua enzima alvo é a 14 alfa demetilase da citocromo P-450. Sendo o fluconazol um triazol, sua seletividade pelo sítio de ação é maior que a dos imidazóis devido ao acréscimo de nitrogênio em seu anel azóico. Além de aumentar a seletividade, o aumento de um átomo de nitrogênio proporciona estabilidade metabólica, prolongando o tempo de meia vida plasmática dos triazóis. Este fármaco forma um complexo com metade do ferro do heme do citocromo P-450, dificultando a fixação e ativação do oxigênio (MCGINNIS; RINALDI 1991; GUPTA et al, 1994a). Os triazóis apresentam metabolismo mais lento quando comparados com os imidazóis, o que lhes confere um efeito mais brando na síntese de esteróis humanos.

Espectro de ação

O fluconazol é amplamente ativo contra fungos patogênicos. Tem atividade contra histoplasmoses, blastomicose, esporotricose e dermatofitoses. É a terapia de escolha para prevenção de meningite criptocócica em pacientes imunodeprimidos (MENICHETTI et al, 1996; LAGUNA et al, 1997; SINGH et al, 1996) e é eficaz contra a candidíase orofaríngea e vaginal (RUHNKE et al, 1996). O fluconazol não é eficaz na terapia de candidíases em pacientes neutropênicos e no tratamento ou na prevenção da aspergilose.

Toxicidade

Estudos em animais, mostraram a ocorrência de efeitos adversos fetais apenas com altas doses da droga. Porém, alguns autores têm relatado efeitos hepatotóxicos e teratogenicidade (DOLLERY, 1992a; PURSLEY et al, 1996).

Farmacocinética

O fluconazol é usualmente administrado por via oral, mas pode ser administrado por via endovenosa quando necessário. Apresenta absorção rápida. As concentrações plasmáticas independem da via de administração e sua biodisponibilidade é conservada mesmo quando ingerido com

alimentos e na presença do suco gástrico. Os níveis máximos de concentração plasmática variam de 4 a 8µg/ml após repetidas doses de 100mg. Sua excreção renal é cerca de 90% e a meia vida é em torno de 25 a 30 horas. No líquido cefalorraquidiano são encontrados cerca de 11 a 12 % da sua concentração plasmática. Também é detectado nos líquidos corporais, inclusive no escarro e na saliva. Entretanto, sua maior concentração encontra-se no líquido cefalorraquidiano (BENNETT, 1996; DOLLERY, 1992a).

Uso terapêutico

O fluconazol é considerado terapia de escolha para o tratamento da meningite criptococcócita em virtude de sua melhor penetração no LCR e menor morbidade do que a anfotericina B. A atividade de resposta ao fármaco é inferior quando comparada ao itraconazol diante de doenças como a histoplasmose, blastomicose, esporotricose e as dermatífitoses. Atua na candidíase orofaríngea e na candidíase vaginal. É útil no tratamento da candidemia em pacientes não imunocompetentes. Em doses diárias de 200 mg é considerado o tratamento de escolha para prevenir recidivas de meningite criptococócica em pacientes imunodeprimidos e para casos agudos são indicados 100 a 200mg por dia. Em candidíase oral, a dose recomendada é de 50 a 100mg e em casos de candidíase vaginal é indicada dose única de 150mg (DOLLERY, 1992a).

Efeitos indesejáveis

Doses superiores a 200mg diárias podem causar náuseas e vômitos. O uso prolongado por mais de uma semana pode determinar os efeitos colaterais, incluindo náuseas, cefaléia, vômitos, erupções cutâneas, dores abdominais e diarreia. Poucos são os relatos de casos de óbito por insuficiência hepática e por síndrome de Stevens- Johnson, associados ao fluconazol (DOLLERY, 1992a; SAAG; DISMUKES, 1988).

Interações medicamentosas

O fluconazol não sofre alteração em presença de acidez gástrica. A rifampicina reduz levemente o fluconazol. Os níveis deste fármaco são elevados na presença de fenitoína, rifabutina, ciclosporina, sulfoniluréias e varfarina. Pode causar algumas alterações no metabolismo da teofilina e de anticoncepcionais orais (DOLLERY, 1991a; GUPTA et al, 1994 a).

Resistência

O uso indiscriminado de fluconazol na terapia fúngica pode estar desenvolvendo uma certa resistência em algumas cepas de *Candida albicans* e de outras espécies (CARTLEDGE et al, 1997; MENICHETTI et al, 1996; RODRIGUEZ-TUDELA, 1995; RUHNKE et al, 1994; RUHNKE et al, 1996). Até mesmo seu uso descontrolado na profilaxia de candidíase em

pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida pode estar colaborando com o surgimento de cepas resistentes (BAILY et al, 1994; LACASSIN et al, 1996; SANGEORZAN et al, 1994). Alguns estudos realizados *in vitro* demonstraram uma inesperada resistência de *Candida krusei* ao fluconazol. (CATLEDGE et al, 1997) Também em outro estudo, utilizando o fluconazol como droga de escolha na terapia de candidíase vaginal, observou-se que algumas cepas de *Candida* não responderam a este antifúngico (SOBEL; VASQUES, 1996). A resistência aos imidazóis ou aos triazóis é muito rara entre fungos causadores de micoses superficiais.

A opção por um desses agentes deve basear-se no custo e na disponibilidade.

7-GRISEOFULVINA

A griseofulvina, descoberta em 1938, é um derivado benzofurano, com fórmula estrutural semelhante a da colchicina., produzida por *Penicillium griseofulvum*. Apresenta-se na forma de pó insípido, inodoro, branco ou creme. É solúvel em dimetilformanida e dimetilsulfóxido, pouco solúvel em etanol, acetona, benzeno, clorofórmio, acetato de etila, ácido acético e insolúvel em água (BENNETT, 1996; REYNOLDS et al 1996).

Mecanismo de ação

A griseofulvina induz a produção de células multinucleadas inibindo a mitose do fungo. Atua nos microtúbulos dos fusos mitóticos desorganizando-os. Esses microtúbulos transportam material secretório até a periferia da célula. Também interfere na polimerização normal da proteína microtubular, mediante ligação com RNA, o que resulta na inibição de síntese de proteínas e na diminuição dos processos de síntese celular (BENNETT, 1996; MCGINNIS; RINALDI, 1991; KOBAYASHI; MEDOFF, 1977; YU; BLANK, 1973).

Espectro de ação

A griseofulvina apresenta atividade fungistática *in vitro* para várias espécies de dermatófitos (FURTADO, 1991; LACAZ et al, 1991; LESHER; SMITH, 1987; MARCHI, 1991; MCGINNIS; RINALDI, 1991; ZAITZ, 1992). A droga não apresenta atividade sobre bactérias e outros fungos (RIPPON, 1974).

Toxicidade

Estudos em animais mostraram que, em altas doses, a griseofulvina é carcinogênica e teratogênica. Este fármaco não deve ser utilizado para tratar infecções triviais que respondem à terapia tópica.

Farmacocinética

Alguns estudos demonstram que a griseofulvina apresenta melhor absorção quando ingerida com alimentos gordurosos (LACAZ et al, 1991). Concentrações plasmáticas de aproximadamente 1µg/ml são atingidas dentro de 4 horas após a administração oral de meia grama de griseofulvina. As taxas de dissolução e de desagregação limitam a biodisponibilidade da griseofulvina. Distribui-se amplamente nos fluidos e tecidos do organismo, concentrando-se no fígado, tecido adiposo e músculo esquelético. O fármaco é depositado em células precursoras de ceratina. Essa distribuição explica sua ação em micoses superficiais. A griseofulvina tem meia vida de 24 horas e 50% da dose oral pode ser detectada na urina sob a forma de metabólitos (KOBAYASHI; MEDOFF, 1977; RIPPON, 1974).

Uso terapêutico

As doenças micóticas de pele, cabelos e unhas respondem à terapia com griseofulvina. O fármaco tem boa atividade contra dermatofitoses, mas pode haver resistência em casos de infecções por *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*. Esse problema pode ser superado mediante o aumento da dose ministrada (MARCHI, 1991; ZAITZ, 1992).

Efeitos indesejáveis

Os efeitos colaterais associados ao uso da griseofulvina são escassos. A cefaléia é o efeito mais freqüente, mas em geral desaparece no decorrer do tratamento. Outros efeitos observados são: distúrbios gastrointestinais, erupções cutâneas, distúrbios visuais, discrasias sanguíneas, hepatotoxicidade e proteinúria com insuficiência renal. Os efeitos hematológicos incluem leucopenia, neutropenia, basofilia pontilhada e monocitose. Manifestações do sistema nervoso incluem neurite periférica, letargia, confusão mental, cansaço, síncope, vertigem e turvação visual (LACAZ et al, 1991; LESHER ; SMITH, 1997, MARCHI, 1991).

Interação medicamentosa

A griseofulvina induz as enzimas hepáticas e, portanto, aumenta a taxa de metabolismo da varfarina. É provável que esse mesmo mecanismo seja também capaz de reduzir a eficácia de alguns anticoncepcionais orais. Seu uso concomitante com barbitúricos pode reduzir os níveis plasmáticos do antibiótico. A griseofulvina diminui o efeito de anticoagulantes e a tolerância ao álcool (LACAZ, et al, 1991; LESHER; SMITH, 1997).

Resistência

Os mecanismos de resistência dos dermatófitos a griseofulvina não estão bem elucidados. Alguns autores acreditam que os dermatófitos com micélio bem desenvolvido são mais resistentes do que os dermatófitos em fase inicial de crescimento, sugerindo que os primeiros liberem enzimas capazes de hidrolizar a griseofulvina (SCHOLER; POLAK, 1984). Em um trabalho de revisão sobre o tratamento de tinea unguium, foi observada uma baixa frequência de cura microbiológica com griseofulvina (KONEMAN; ROBERTS, 1987). Estudos *in vitro* já demonstraram a indução de resistência de dermatófitos a griseofulvina (MINANI et al, 1980; ROBISON et al, 1960).

Muitos autores atribuem a falha terapêutica do fármaco principalmente ao uso de dose e esquema terapêutico inadequados (HOFBAUER et al, 2002).

**ANTIFUNGIGRAMAS E AGENTES DA
CROMOBLASTOMICOSE**

Considerando-se a necessidade de amplos estudos para tentar controlar ou solucionar as dificuldades clínicas relacionadas ao tratamento da cromoblastomicose, ressalta-se a carência de rotineiros testes de sensibilidade *in vitro* para subsidiar a clínica na escolha da terapia antifúngica adequada para cada paciente. Os testes de sensibilidade tornam-se cada vez mais necessários, tendo em vista a crescente resistência celular e clínica aos antimicóticos disponíveis (GHANNOUM et al, 1996; REX et al, 1993).

Os testes de sensibilidade *in vitro* podem ser considerados para comprovar a resposta do agente isolado aos fármacos, controlar a terapia em pacientes e pesquisar drogas alternativas para o tratamento. Em micologia, a aplicação destes testes é mais complexa do que em bacteriologia, devido as características morfológicas e fisiológicas dos fungos e as propriedades físico-químicas das drogas antifúngicas. Uma das principais dificuldades é a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos azóis, em vista da ocorrência de inibição parcial promovida por esses fármacos (REX et al, 1993).

Mesmo assim, ao contrário do que se observa para algumas espécies de leveduras, poucos estudos têm sido conduzidos com bolores, sobretudo com fungos demácios, na tentativa de se estabelecer antifungigrama padrão, capaz de prever a resposta à terapia ou, ao menos, de possibilitar a ampliação dos nossos conhecimentos quanto a resposta desses microrganismos aos antimicóticos disponíveis (ESPINEL-INGROFF et

al, 1998; ESPINEL-INGROFF et al, 1995; NCCLS, 1992; NCCLS, 1997, NCCLS, 2002; REX et al, 1997).

As técnicas utilizadas na execução de antifungogramas são adaptações daquelas empregadas para bactérias e compreendem a diluição em ágar e a difusão em ágar (ESPINEL-INGROFF et al, 1991). Porém, tanto o fato de a maioria dos antifúngicos não ser hidrossolúvel quanto a ocorrência de dificuldades de se confeccionar inóculos padronizados, sobretudo com fungos filamentosos, representam obstáculos que dificultam o desenvolvimento destes testes. Além disso, a ausência de uma metodologia mundialmente aceita, torna impraticável as comparações dos resultados entre os laboratórios, devido a influência de variáveis como: meio de cultura empregado, pH do meio, tampões utilizados, concentrações dos inóculos, tempo e temperatura de incubação, e a ocorrência de inibição parcial nos testes, principalmente em se tratando de azóis (ESPINEL-INGROFF, 1996; GRAYBILL, 1992).

Na tentativa de estabelecer um método padrão para avaliar a sensibilidade dos fungos frente aos antimicóticos, o Nacional Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS) estabeleceu um grupo de estudo que abordou critérios como: características biológicas dos fungos, propriedades físico-químicas dos antifúngicos e as condições técnicas de ensaio. O estudo, iniciado em dezembro de 1992, resultou no documento denominado M27-A, que descreve uma proposta de metodologia padronizada, baseada na técnica de diluição em caldo. Esse estudo inicialmente priorizou os fungos leveduriformes, sobretudo *Candida* spp e

Cryptococcus neoformas, considerados como responsáveis pela maioria das infecções fúngicas. A técnica proposta pelo NCCLS (M27-A) é preconizada como reprodutível, mas representa um procedimento bastante trabalhoso e de custo elevado para utilização rotineira.

A adaptação desse teste a técnicas de microtitulação facilitou a execução da prova e sua leitura, com custos reduzidos (ESPINELL-INGROFF et al, 2000).

Embora a incidência de infecções fúngicas severas causadas por bolores seja menor que a de infecções por leveduras, o crescente aumento da população de pacientes imunocomprometidos que sofrem infecções causadas por bolores e a dificuldade no tratamento das mesmas tem sido preocupante. Considerando a necessidade de seleção e monitoramento da terapia antifúngica para essas micoses, o NCCLS desenvolveu e publicou o M38-A, documento específico para testes de sensibilidade com bolores, incluindo *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Rhizopus* spp, *Pseudallescheria boydii* e *S. schenckii* (NCCLS M38-A, 2002), utilizando também a técnica de diluição em caldo.

Por outro lado, diversos autores empregam provas comerciais, baseadas na técnica de difusão em ágar a partir de discos com antifúngicos ou de fita plástica que contém um gradiente de concentração antifúngica (E-test). Em vista da relativa simplicidade em sua execução e da similaridade de seus resultados com os dos testes do NCCLS, essas provas, sobretudo o E-test, podem constituir um método alternativo com potencial uso em rotina laboratorial (ESPINEL-INGROFF et al, 2000). Essas considerações podem

ser válidas para avaliação de diversas leveduras, mas ainda não o são para fungos filamentosos. Para estes, ainda são necessários estudos mais amplos, a fim de se estabelecer a viabilidade da aplicação de testes comerciais com diversos antifúngicos (PFALLER et al, 2002).

Mesmo que testes propostos pelo NCCLS, ou suas modificações proposta pelo Comitê Europeu, (EUCAST) Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2002; PFALLER et al, 1994, DAYER et al, 1998), e provas comerciais estejam disponíveis para se verificar a sensibilidade dos fungos a um ou mais antimicóticos, a correlação desses achados com os resultados clínicos ainda é objeto de estudo (ESPINELL-INGROFF, 2000).

Além disso, esses testes não permitem o concomitante estudo de um grande número de cepas. Podem requerer o uso de diferentes meios de cultura para diferentes antifúngicos, a leitura dos resultados pode ser dificultada pela ocorrência de inibição parcial pelos azóis e/ou não são adequados para continuação da prova para estudo de concentração fungicida mínima (CFM). Por outro lado, o teste de diluição em ágar pode ser indicado quando se requer estudo concomitante de um grande número de cepas. Apresenta vantagens como a avaliação de fungos de crescimento lento, com menor desidratação do meio e melhor aeração para crescimento fúngico que os testes em caldo, ausência de inibição parcial e estudo da CFM do antifúngico.

Pesquisas realizadas por diversos autores mostraram que o método de diluição em ágar, uma vez padronizado, pode ser indicado para estudo de

leveduras e bolores frente a diversos antifúngicos, utilizando-se o YNB como meio para teste (SOARES; CURY, 1995; SOARES et al, 1995; CHANG; CURY, 1998; CURY; HIRSCHFELD, 1997; ALVES; CURY, 1992, ANDRADE et al em publicação).

Mesmo que diversas técnicas estejam disponíveis, são relativamente poucos os estudos com fungos demáceos, sobretudo com agentes da cromoblastomicose, e raros os de correlação entre resultados *in vitro* e *in vivo* (FINQUELIEVCH et al, 2000). Em 1973, RESENDE et al (1973), utilizando técnica de diluição em ágar, verificou que esses agentes eram resistentes a 5-FC, um resultado compatível com a resposta clínica. Mais tarde, a autora (RESENDE, 1979) comprovou, por meio de técnica de diluição em caldo, ocorrência de sinergia entre AnB e 5-FC, e esse achado também foi concordante com a resposta clínica. Outros estudos, empregando diluição em caldo (CORRADO et al, 1982) ou diluição em ágar (ESPINEL-INGROFF et al, 1984), mostraram que fungos causadores de cromoblastomicose eram resistentes a antifúngicos poliênicos e azólicos e que a associação do cetoconazol com 5-FC resultava em sinergia. Entre os trabalhos mais recentes, os quais utilizam, em geral, métodos de diluição em caldo, os resultados de sensibilidade para fungos demáceos frente a diversos antimicóticos são controvertidos (BEDOUT et al, 1997; CORRADO, 1982; MCGINNIS; PASSARELL, 1998; MCGINNIS et al, 1998; RESENDE et al, 1997). No contexto clínico-laboratorial, destaca-se o trabalho de Andrade et al (2003) que, em estudo de pacientes com cromoblastomicose, encontraram correlação entre os resultados *in vitro*, obtidos por meio de

técnica de diluição em ágar, e a resposta clínica ao tratamento com itraconazol.

Para avaliar os testes de sensibilidade, é fundamental a identificação do agente isolado e sua potencialidade de resistência ao antifúngico. Entretanto, a falência terapêutica pode estar relacionada com a clínica do paciente, o que pode explicar a falta de correlação entre achados laboratoriais e a resposta clínica para um determinado quimioterápico.

PROPOSIÇÃO E OBJETIVOS

Considerando-se

- a carência de estudos de sensibilidade *in vitro* relacionados aos fungos demáceos
- a dificuldade encontrada na tentativa de cura da cromoblastomicose
- a aparente resistência a monoterapia com determinados antifúngicos
- os limitados conhecimentos para adequada utilização de terapia associada

propusemos a realização deste trabalho, com os seguintes objetivos:

- avaliar a sensibilidade de agentes da cromoblastomicose a alguns antimicóticos, utilizando-se a técnica de diluição em ágar.
- determinar o perfil de sensibilidade de agentes da cromoblastomicose, isolados de modo seqüencial , de diversos pacientes.
- estudar a eficácia *in vitro* da associação entre AnB e outros antimicóticos contra os fungos demáceos.

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.

Todos os pacientes que aceitaram participar neste estudo receberam um Termo de Consentimento, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da USP e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

1-Pacientes

Foram incluídos, neste estudo, 18 pacientes com cromoblastomicose confirmada, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Com exceção de três, todos eram do sexo masculino. Sete pacientes tiveram acompanhamento clínico e micológico durante meses ou anos. Para esses, a gravidade do quadro clínico foi estabelecida com base na escala de pontuação sugerida por QUEIROZ-TELES FILHO (1992), seguindo-se critérios clínicos, sem abordagem de critérios imunológicos. A avaliação clínica dos pacientes foi realizada pelo Dr. Luiz Guilherme Martins de Castro.

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

2-Microrganismos

A partir dos 18 pacientes foram isoladas 39 amostras de fungos demáceos de modo seriado ou não. Também foram estudadas cinco cepas escolhidas aleatoriamente entre as amostras obtidas, para realização da curva de crescimento.

Foram incluídas nos testes de sensibilidade duas cepas padrões: *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428. Para a primeira são conhecidas as concentrações inibitórias mínimas de alguns antifúngicos (PFALLER et al, 1995; REX et al, 1996).

Os microrganismos em estudo e a cepa ATCC 46428 foram mantidos em ágar batata dextrose, com repiques sucessivos de três meses. Para inclusão nos testes de sensibilidade, os repiques foram realizados a cada 14 dias e incubados a 30°C. A cepa ATCC 22019 foi mantida em ágar Sabouraud a 30°C e repicada 24 horas antes dos testes de sensibilidade.

3- Exames micológicos

3.1. Material biológico e Exame direto

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

3.2 Cultivo

A outra parte do material foi semeada em ágar Sabouraud, acrescido de cloranfenicol e em ágar Mycobiotic. A incubação foi realizada a 30°C, por 30 dias. As colônias, assim desenvolvidas, foram repicadas em ágar batata contido em placas e em lâminas (técnica de RIDDELL, 1950) para estudo, respectivamente, da macro e da micromorfologia das cepas isoladas. A partir desses estudos foram realizadas um total de 39 identificações.

4- Cultivos para o inóculo

Para a preparação do inóculo, estudou-se primeiro a curva de crescimento de cinco cepas, escolhidas ao acaso, a fim de se estabelecer a idade dos cultivos na qual a proporção entre o micélio vegetativo e o reprodutor era equivalente. Cada curva foi obtida com base em contagens em câmara de Neubauer do número de células contidas em uma suspensão. Cada amostra foi avaliada após crescimento durante 7, 10, 14, 21, 28 e 35 dias em ágar batata. Com cuidado, as colônias foram raspadas com alça e transferidas para tubo com água destilada e pérolas de vidro. Após lavagem por centrifugação e agitação vigorosa, a suspensão foi diluída 1/10 e procedeu-se à contagem das células (Em anexo). Juntamente com as contagens foram avaliadas a micromorfologia das cepas, para se ter noção da proporção entre células vegetativas e germinativas em cada período estudado. Essas últimas observações também foram realizadas em

montagens preparadas com fragmentos das colônias em lactofenol-azul de algodão (ANDRADE, 1999).

5- Antifungigramas

5. 1. Meios de Cultura

5. 1. 1 Ágar Sabouraud Dextrose (ASD)

O 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 ensaios (10mm x 145mm) esterilizados e geleificados em posição inclinada.

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

5. 1. 2 Meio concentrado (10x):

Composição:

- Yeast Nitrogen Base(YNB).....6,7g
- L- asparagina1,5g
- Glicose.....10g
- Tampão de fosfato (0,01M).....100ml

Preparação:

Os componentes sólidos foram dissolvidos em tampão de fosfato pré-aquecido. A solução resultante foi esterilizada por filtração e conservada, em frasco esterilizado, a 4°C. Esse meio foi utilizado para determinar as CIMs dos antifúngicos nos testes de sensibilidade.

5. 1. 3 Ágar tampão de fosfato**Composição:**

- NaH_2PO_40,33g
- K_2HPO_40,92g
- Ágar.....11,0g
- Água destilada q.s.p.....1000ml

Preparação:

O ágar foi adicionado à água e a mistura foi aquecida até ebulição. Os componentes fosfatados foram então adicionados e, após homogeneização, o pH foi ajustado a 7,0 com NaOH 1N. Volumes adequados 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. Esse meio foi utilizado para determinar as CIMs dos antifúngicos nos testes de sensibilidade.

5. 1. 4 Tampão de fosfato (0,01 M)

Composição:

- NaH_2PO_40,33g
- K_2HPO_40,92g
- Água destilada.....1000ml

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 concentrado e na solução de Tween 80.

5. 1. 5 Solução de Tween 80

Composição:

- Água destilada500ml
- Tween 80.....0,25ml

Preparação:

A água, levemente aquecida, foi adicionada 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.

5. 2 Antifúngicos e soluções estoque

Neste estudo, os testes de sensibilidade foram realizados pela técnica de diluição em ágar, com base na metodologia de Soares e Cury (1993; 1998) . Algumas modificações foram efetuadas para atender às diferenças morfológicas e bioquímicas dos fungos demácios em questão.

Para os testes de sensibilidade foram utilizados antifúngicos gentilmente cedidos pelos fabricantes. Preparações intravenosas comerciais de anfotericina B (Fungizon, BRYSTOL MEYERS SQUIBB, São Paulo, Brasil) e fluconazol (LOTEC, PFIZER, Guarulhos, São Paulo) foram utilizadas como soluções estoque, com concentrações de 5000 µg/ml e 2000µg/ml, respectivamente. Os outros agentes, fornecidos sob a forma de pó, incluíram itraconazol e cetoconazol (JANSSEN FARMACÊUTICA, São Paulo, Brasil), além de terbinafina (NORVATIS, São Paulo, Brasil), 5-fluorocitosina (SIGMA-ALDRICH) e griseofulvina (SCHERING- PLOGH, São Paulo).

A solução estoque da 5-fluorocitosina, dissolvida com água destilada, e as respectivas soluções dos outros antifúngicos, dissolvidos com dimetilsulfóxido (DMSO), foram preparadas 100x concentradas (em relação a maior concentração da droga no teste).

Volumes de 8 ml de cada solução foram distribuídos em tubos de ensaio e conservados a - 70°C até o uso.

5. 2. 1 Diluições dos antifúngicos

5. 2. 1. 1 Teste com antifúngicos isolados

A partir de soluções estoque, foram preparadas diluições seriadas em água, a fim de se obter concentrações de 1280 a 2,5µg/ml para a AnB, de 1280 a 5,0µg/ml para o fluconazol e de 2000 a 7,8 para a 5-FC. Para os outros antifúngicos essas diluições foram realizadas em DMSO e as concentrações foram de 480 a 0,8µg/ml para a terbinafina, 640 a 2,5µg/ml para o cetoconazol, de 640 a 0,6µg/ml para o itraconazol e de 2560 a 10µg/ml para a griseofulvina.

Volumes de 2 ml de cada diluição de fluconazol ou 1,0 ml de outro antifúngico foram transferidos para tubos de ensaio contendo 2 ml de meio concentrado e, após homogeneização, as soluções foram mantidas a -20°C até o momento do uso no teste de sensibilidade.

5. 2. 1. 2 Teste com antifúngicos associados

Nesse caso, cada diluição da AnB foi associada a cada uma das diluições de outro antifúngico.

Utilizando-se os mesmos procedimentos do teste com drogas isoladas, foram preparadas diluições seriadas de AnB contendo concentrações variáveis de 200 µg/ml a 25 µg/ml. Volumes de 0,5 ml de cada diluição foram respectivamente transferidos para tubos com 2 ml de

meio concentrado e 2 ml de uma das diluições de fluconazol, referidas no teste anterior, ou 0,5 ml de outro antifúngico, em concentração duas vezes maior que a do teste anterior. Essas soluções foram conservadas a -20°C até o uso nos testes de sensibilidade.

5. 3. Inóculo

Com base em estudo prévio adotou-se, como inóculo, uma suspensão contendo, em cada ml, cerca de 4×10^4 células do fungo em estudo, com 14 dias de crescimento em ágar batata a 30°C .

Candida parapsilosis ATCC 22019 foi utilizada com 24 horas de cultivo em ágar Sabouraud a 30°C .

Preparação:

Com auxílio de alça em anel, a superfície da colônia do fungo foi raspada cuidadosamente e as células foram transferidas para tubo de ensaio contendo 5ml de água destilada, esterilizada, e com 4 pérolas de vidro. O tubo foi submetido a agitação vigorosa em vortex por 1 minuto, a fim de se obter separação das células hifálicas. A suspensão resultante foi descartada e o sedimento foi lavado duas vezes, por centrifugação, com 3 ml de água e finalmente suspenso em 5 ml de solução Tween 80. Em seguida, 1 ml foi transferido para um tubo de ensaio contendo 9 ml dessa solução e a suspensão foi ajustada à turvação do padrão 0,5 da escala de McFarland.

Estudos preliminares mostraram que a turvação 0,5 da escala de McFarland é equivalente a 200 células/5µl ou 4×10^4 células/ml (ANDRADE, 1999).

5. 4. Execução dos testes

Estas provas foram realizadas três vezes em duplicata.

5. 4. 1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As diferentes diluições do antifúngico foram estabilizadas a temperatura ambiente e o ágar tampão fosfato foi fundido e estabilizado a 56°C. Em seguida, o conteúdo de cada tubo com antifúngico foi adicionado de um volume suficiente de ágar tampão para 20 ml e a mistura foi homogeneizada e vertida em placa de Petri. Foram incluídas nos testes placas contendo apenas ágar YNBP, para controle de crescimento, e placas com ágar YNBP adicionado de 2,5% de DMSO, para se verificar interferência do solvente.

Após geleificação, 5µl de cada inóculo foram depositados no meio de ágar. Esse procedimento permitiu a aplicação de 24 inóculos por placa. Estas foram mantidas a temperatura ambiente até completa absorção da fase líquida dos inóculos. Em seguida, foram colocadas a 30°C até o crescimento (em geral entre o 3º e o 4º dia de incubação) das cepas no meio sem droga. A última leitura era realizada no 7º dia. A CIM para a cepa controle ATCC 22019 foi determinada em 24 horas de incubação.

Foi considerada concentração inibitória mínima, a menor concentração da droga, quando isolada ou combinada, que impediu visível crescimento de determinado fungo.

5. 4. 2. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Com o auxílio da alça em anel, e evitando-se a transferência de meio, cada inóculo que não apresentou desenvolvimento no teste anterior foi cuidadosamente removido e semeado em ágar Sabouraud. As leituras foram realizadas após 14 dias de incubação a 30°C. Foram incluídas nos testes, placas com repiques das cepas do controle de crescimento do teste CIM. Foi considerada concentração fungicida mínima, a menor concentração da droga, quando isolada ou combinada, que impediu visível crescimento do subcultivo de um determinado fungo.

5. 5 Avaliação da atividade das drogas isoladas e associadas

Os resultados finais das CIMs e CFMs de cada droga, tanto isolada quanto associada, foram obtidos por média geométrica dos valores encontrados em repetidos testes de sensibilidade. A partir desses resultados, foram determinadas as concentrações inibitórias fracionárias (CIFs) e as concentrações fungicidas fracionárias (CFFs) da droga quando associada (PETROU ; ROGERS, 1991; VAN DER AUWERA, 1992).

A CIF de uma droga (CIF_A) é calculada dividindo-se o valor de sua CIM quando combinada (CIM_{A+B}) pelo valor de sua CIM quando isolada (CIM_A). A soma das CIFs (ΣCIF ou CIF_{AB}) das drogas combinadas ($CIF_A + CIF_B$) fornece um valor relacionado ao tipo de atividade resultante da interação.

Assim:

$$\Sigma CIF \text{ ou } CIF_{AB} = CIF_A + CIF_B = \left(\frac{CIM_{A+B}^A}{CIM_A} \right) + \left(\frac{CIM_{A+B}^B}{CIM_B} \right)$$

Quando:

$\Sigma CIF < 1$, associação é considerada sinérgica;

$\Sigma CIF = 1$, a associação é aditiva;

$1 < \Sigma CIF < 2$, a associação é indiferente.

$\Sigma CIF \geq 2$, é antagônica.

As operações foram semelhantes para se obter ΣCFF , a considerando-se as CFMs das drogas associadas.

$$\Sigma CFF \text{ ou } CFF_{A+B} = CFF_A + CFF_B = \left(\frac{CFM_{A+B}^A}{CFM_A} \right) + \left(\frac{CFM_{A+B}^B}{CFM_B} \right)$$

Para efeito de cálculo, ao resultado de CIM ou de CFM que ultrapassou para mais ou para menos o valor de uma concentração limite utilizada no teste, foi atribuído o mesmo valor dessa concentração.

Para se estabelecer a sensibilidade ou a resistência dos fungos em estudo frente as drogas isoladas, considerou-se os níveis alcançados pelas drogas no soro (BENETT, 1996; RICHADSON;WARNOCK, 1993). 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 CIMs e/ou CFMs $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$, ao fluconazol as que responderam a $\leq 8,0$ $\mu\text{g/ml}$, a 5-fluorocitosina a ≤ 50 $\mu\text{g/ml}$, a terbinafina a $\leq 1,5$ $\mu\text{g/ml}$, ao cetoconazol a ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$ e a griseofulvina a $\leq 0,46$ $\mu\text{g/ml}$.

RESULTADOS

Ao exame direto, todas as amostras obtidas dos pacientes foram positivas para células muriformes. Com base na macromorfologia e na micromorfologia das colônias isoladas, foram identificadas 37 amostras de *Fonsecaea pedrosoi*. As cepas restantes, incluídas nos testes de sensibilidade, foram confirmadas como, *Exophiala* spp (cepa 49) ou *Rhinocladiella* spp(cepa 62), (Tabela 1).

As cinco amostras, utilizadas na determinação da curva de crescimento mostraram, segundo a teoria dos mínimos quadrados, perfis de crescimento similares. Microscopicamente, verificou-se que no 7º dia de incubação havia intensa produção de células vegetativas e raros conídios. Entre o 10º e o 14º dia a proporção entre células vegetativas e conídios era relativamente equivalente. Entre o 18º dia e o 21º dia havia pequena produção de células vegetativas e intensa formação de conídios. A partir do 21º dia ocorreu uma redução ainda maior de células e redução dos conídios, com tendência a estabilização do crescimento (Figura 1).

A partir desses dados, optou-se pela utilização de cultura com 14 dias de incubação para a preparação do inóculo dos fungos demáceos nas provas de sensibilidade.

Nos testes com as drogas isoladas, as CIMs mostraram que as amostras eram, de modo geral, sensíveis ao cetoconazol, à terbinafina e ao itraconazol. Somente 13 amostras foram sensíveis à AnB, sete a 5-FC, uma ao fluconazol e duas a griseofulvina. A cepa padrão ATCC 46428, *F. pedrosoi*, foi sensível à AnB, ao itraconazol, ao cetoconazol e à terbinafina, mas não à 5-FC e ao fluconazol (Tabela 2).

Nos testes de CFM somente duas cepas foram sensíveis à atividade letal da AnB, nove a do itraconazol, 19 a do cetoconazol e três a da 5-FC . Quatro não responderam a terbinafina até a maior concentração usada no teste. Apenas uma cepa foi sensível ao fluconazol e outra à griseofulvina (Tabela 3).

A associação entre o poliênico e o itraconazol potencializou a atividade antifúngica de ambas as drogas contra algumas das amostras. Nesse caso, a AnB mostrou CIMs e CFMs de 0,156 a 5,0µg/ml e o itraconazol de 0,03µg/ml a 32µg/ml. Com base nas Σ CIFs e Σ CFFs, observou-se ocorrência de associações indiferente, sinérgica e antagônica, mas a indiferente foi predominante (Tabela 4).

A associação entre AnB e terbinafina potencializou as atividades inibitória e letal de ambas as drogas frente a maioria das cepas estudadas. As CIMs e as CFMs da AnB foram de 0,156µg/ml a 0,625µg/ml e as da terbinafina variavam de 0,04µg/ml a 12µg/ml. Considerando-se as Σ CIFs e Σ CFFs resultantes desta associação, a ocorrência de interação indiferente foi predominante. Frente a sete amostras houve sinergia quanto a atividade fungistática, mas apenas contra cinco delas a interação foi também sinérgica para a atividade fungicida das drogas (Tabela 5).

Para a associação de AnB com cetoconazol também houve a potencialização das atividades inibitória e letal de ambas as drogas para determinadas amostras. Neste caso, as CIMs e CFMs da AnB variaram de 0,625µg/ml a 5µg/ml e do cetoconazol variavam de 0,06µg/ml a 32µg/ml. Os

índices resultantes desta associação, também mostraram a ocorrência de associações indiferente, sinérgica e antagônica (Tabela 6).

Na associação entre AnB e 5-FC verificou-se interação sinérgica para a atividade inibitória das drogas frente a 21 amostras. Contra apenas cinco dessas, a sinergia foi também observada para a atividade letal e frente a 16 a interação foi indiferente. Para as outras cepas a associação mostrou-se indiferente ou antagônica (Tabela 7).

A associação entre a AnB e o fluconazol ou a griseofulvina potencializou principalmente a atividade antifúngica do poliênico. Observou-se ocorrência de sinergia frente a algumas amostras, mas contra a maioria delas a interação foi indiferente (Tabelas 8 e 9).

A tabela 10 ilustra os resultados obtidos com amostras sequenciais de sete pacientes. Com algumas exceções, os isolados não responderam as concentrações de AnB utilizadas no teste. O itraconazol foi fungistático para todas as cepas em concentrações passíveis de serem alcançadas no soro e fungicida apenas contra duas amostras isoladas do paciente 2 e a primeira do paciente 5. Nesse último caso, foi nítida a resistência das amostras seqüenciais frente a esse azol. A terbinafina foi fungistática e fungicida para todos os isolados, excetuando-se o último do paciente 5. Ao contrário das outras drogas, a 5-FC, não mostrou atividade antifúngica contra as cepas desses pacientes.

A tabela 11 mostra as concentrações inibitórias fracionárias (CIFs) e as concentrações fungicidas fracionárias (CFFs) da associação entre o poliênico e cada um dos outros antifúngicos frente aos isolados iniciais e

seqüenciais. Considerando-se as CIFs, a combinação AnB-itraconazol foi sinérgica frente a todos os isolados iniciais de pacientes sem tratamento (pacientes 1, 2, 5 e 7), ao contrário daqueles oriundos de pacientes já submetidos a terapia (pacientes 3 e 4). A interação da AnB com terbinafina, cetoconazol, fluconazol ou com griseofulvina foi, na maioria dos casos, indiferente, enquanto com 5 FC foi principalmente sinérgica.

O quadro 1 inclui algumas informações sobre os pacientes dos quais foram obtidas amostras sequenciais. Com idade variando de 51 a 70 anos, todos os indivíduos, excetuando-se as duas mulheres desses grupo, tinham ocupação ligada ao solo. Apenas em um paciente o comprometimento envolvia membro inferior esquerdo, enquanto nos demais ocorria em inferior direito. A duração da doença variou de seis meses a 13 anos, com grande, moderada ou pequena gravidade.

O quadro 2 mostra o tratamento ministrado e o aspecto clínico da infecção na data da coleta de amostra de pacientes sob acompanhamento. Mesmo com terapia continuada durante meses ou anos, não foi observada cura clínica para qualquer dos casos.

FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Curva de crescimento de *Fonsecaea pedrosoi* em ágar batata a 30°C

Figura 1: Curva de crescimento de *F. pedrosoi* (cepa 33) em ágar batata a 30°C.

Tabela 1. Procedência, exames micológicos e identificação de 18 pacientes com cromoblastomicose.

Paciente	Cepa	Procedência	Exame direto	Identificação
1	19	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
1	27	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
1	29	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
1	30	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
2	20	Instituto. Adolfo Lutz	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
2	22	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
2	31	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
2	50	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
2	55	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
2	57	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
2	65	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
2	69	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
2	70	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
3	26	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
3	41	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
3	45	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
4	43	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
4	46	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
4	47	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
5	48	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
5	51	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
5	66	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
6	56	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
6	60	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
6	63	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
6	68	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
7	64	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
7	67	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
8	23	Instituto Adolfo Lutz	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
9	28	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
10	33	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
11	34	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
12	40	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
13	44	Laboratório. Fleury	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
14	49	PUCC Campinas	Células muriformes	<i>Exophiala spp</i>
15	53	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
16	54	Hospital das Clínicas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
17	59	Hosp. Emílio Ribas	Células muriformes	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
18	62	Instituto. Adolfo Lutz	Células muriformes	<i>Rhinocladiella spp</i>

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (µg/ml) de diferentes antifúngicos frente a 40 cepas de agentes da cromoblastomicose*

paciente	Cepa	Anb	Itra	Terb	Ceto	5-FC	Fluco	Griseo
1	19	>64	0,06	0,12	≤0,125	>100	>128	16
2	20	>64	0,125	≤0,04	0,35	50	>128	64
2	22	>64	0,06	≤0,04	0,25	>100	>128	32
8	23	>64	0,125	0,50	0,25	>100	>128	64
3	26	>64	0,125	0,12	0,50	>100	>128	1,0
1	27	>64	0,25	≤0,04	≤0,125	>100	>128	16
9	28	32	0,50	0,18	≤0,125	100	>128	64
1	29	>64	0,125	≤0,04	≤0,125	>100	>128	64
1	30	>64	0,25	≤0,04	≤0,125	>100	>128	64
2	31	>64	0,125	≤0,04	≤0,125	>100	>128	32
10	33	4,0	≤0,03	≤0,04	0,50	100	>128	64
11	34	>64	0,125	≤0,04	1,0	>100	>128	64
12	40	0,25	0,125	≤0,04	1,0	>100	128	32
3	41	>64	0,125	0,09	0,50	>100	>128	32
4	43	>64	0,125	≤0,04	0,25	>100	>128	64
13	44	>64	0,125	≤0,04	1,0	>100	>128	>128
3	45	>64	0,125	≤0,04	0,50	>100	>128	64
4	46	>64	0,25	≤0,09	0,50	50	128	16
4	47	>64	0,125	≤0,04	0,50	>100	>128	32
5	48	32	0,125	≤0,04	0,50	>100	>128	64
14	49	≤0,125	0,125	≤0,04	≤0,125	≤0,39	≤0,5	16
2	50	>64	0,125	≤0,04	≤0,125	>100	>128	64
5	51	32	0,125	≤0,04	≤0,125	100	>128	16
15	53	2,00	0,125	0,09	≤0,125	12,5	>128	64
16	54	≤0,125	0,125	0,09	≤0,125	≤0,39	≤0,5	≤0,5
2	55	>64	0,125	≤0,04	≤0,125	>100	64	64
6	56	>64	0,06	≤0,04	≤0,125	>100	>128	>128
2	57	32	0,125	≤0,04	0,25	50	64	>128
17	59	1,0	0,125	≤0,04	0,50	>100	>128	>128
6	60	1,0	0,125	≤0,04	1,0	>100	>128	64
18	62	≤0,125	0,125	≤0,04	1,0	>100	>128	128
6	63	1,0	0,06	≤0,04	0,50	>100	32	64
7	64	0,5	0,125	≤0,04	0,50	>100	128	8,0
2	65	8,0	0,125	0,09	0,25	50	64	64
5	66	32	0,125	0,09	0,35	>100	128	>128
7	67	32	0,125	0,09	0,50	>100	>128	>128
6	68	1,0	≤0,03	0,09	1,0	100	64	64
2	69	1,0	≤0,03	0,09	1,0	>100	>128	16
2	70	1,0	0,25	0,09	1,0	>100	>128	64
	C-1	1,0	0,125	0,187	≤0,125	100	64	64

* AnB: anfotericina; itra: itraconazol; terb: terbinafina; ceto: cetoconazol; 5-FC:5-fluorocitosina; fluco: fluconazol; griseo: griseofulvina; p: paciente; C-1: cepa controle ATCC 46428, *Fonsecaea pedrosoi*

Tabela 3. Concentração fungicida mínima ($\mu\text{g/ml}$) de diferentes antifúngicos isolados frente a 40 cepas de agentes da cromoblastomicose*

paciente	Cepa	Anb	Itra	Terb	Ceto	5-FC	Fluco	Griseo
1	19	nr	>32	0,30	8,0	nr	nr	>128
2	20	nr	>32	$\leq 0,04$	0,5	nr	nr	nr
2	22	nr	>32	0,09	0,5	nr	nr	nr
8	23	nr	>32	3,0	>32	nr	nr	nr
3	26	nr	2,0	24,0	>32	nr	nr	>128
1	27	nr	>32	$\leq 0,04$	>32	nr	nr	>128
9	28	nr	2,0	12,0	>32	nr	nr	>128
1	29	nr	>32	12,0	>32	nr	nr	nr
1	30	nr	16	$\leq 0,04$	>32	nr	nr	>128
2	31	nr	>32	$\leq 0,04$	0,5	nr	nr	>128
10	33	64	16	0,187	0,5	nr	nr	nr
11	34	nr	>32	$\leq 0,04$	1,0	nr	nr	nr
12	40	32	16	$\leq 0,04$	>32	nr	≥ 128	nr
3	41	nr	>32	$\leq 0,04$	>32	nr	nr	nr
4	43	nr	>32	0,187	>32	nr	nr	nr
13	44	nr	>32	24	>32	nr	nr	nr
3	45	>64	>32	$\leq 0,04$	>32	nr	nr	nr
4	46	nr	>32	$\leq 0,04$	2,0	nr	nr	>128
4	47	nr	1,0	$\leq 0,04$	>32	nr	nr	nr
5	48	>64	0,25	$\leq 0,04$	32	nr	nr	nr
14	49	$\leq 0,125$	0,125	$\leq 0,04$	$\leq 0,125$	$\leq 0,39$	nr	nr
2	50	>64	>32	$\leq 0,04$	0,50	nr	nr	nr
5	51	>64	8,0	$\leq 0,04$	16	nr	≥ 128	>128
15	53	8,0	2,0	$\leq 0,04$	$\leq 0,125$	100	≥ 128	nr
16	54	$\leq 0,125$	0,125	0,09	$\leq 0,125$	25	1,0	nr
2	55	>64	>32	0,09	0,25	100	≥ 128	nr
6	56	nr	2,0	$\leq 0,04$	0,50	nr	nr	nr
2	57	>64	32	0,75	0,25	nr	nr	nr
17	59	32	0,25	0,09	1,0	nr	nr	nr
6	60	32	2,0	$\leq 0,04$	1,0	nr	nr	8,0
18	62	32	0,25	0,09	16	nr	nr	>128
6	63	>64	0,125	$\leq 0,04$	1,00	12,5	nr	>128
7	64	>64	0,125	$\leq 0,04$	>32	nr	nr	>128
2	65	64	0,125	$\leq 0,04$	0,25	nr	nr	≥ 128
5	66	>64	32	24	>32	nr	nr	nr
7	67	>64	0,25	$\leq 0,04$	>32	nr	nr	nr
6	68	>64	0,125	$\leq 0,04$	0,50	nr	nr	nr
2	69	32	0,25	0,09	1,0	nr	nr	>128
2	70	>64	32	0,09	16	nr	nr	nr
	C-1	>64	32	0,187	32	nr	nr	nr

* AnB: anfotericina; itra: itraconazol; terb: terbinafina; ceto: cetoconazol; 5-FC: 5-fluorocitosina; fluco: fluconazol; griseo: griseofulvina; nr: não realizados; C-1: cepa controle ATCC 46428, *Fonsecaea pedrosoi*

Tabela 04. Atividade da anfotericina B e do itraconazol quando isolados e associados contra as cepas de agentes da cromoblastomicose*

Amostras	Drogas isoladas (µg/ml)				Drogas associadas (µg/ml)				Índice	
	CIM		CFM		CIM		CFM		CIF	CFF
	AnB	Itra	AnB	Itra	AnB	Itra	AnB	Itra		
19	>64	0,06	nr	>32	0,625	≤0,03	2,50	0,06	0,50	0,04
20	>64	0,125	nr	>32	0,625	≤0,03	0,625	0,06	0,24	1,04
22	>64	0,06	nr	>32	0,625	0,06	0,625	>32	1,00	1,00
23	>64	0,125	nr	>32	0,625	0,06	0,625	0,125	0,48	0,01
26	>64	0,125	nr	2,00	0,625	0,25	2,50	4,00	2,00	2,01
27	>64	0,25	nr	>32	0,625	0,25	0,625	>32	2,00	1,62
28	32	0,50	>64	2,00	0,625	0,06	>5,00	>32	0,14	16,0
29	>64	0,125	nr	>32	0,625	0,25	0,625	>32	2,00	1,62
30	>64	0,25	nr	16	0,625	0,125	2,50	>32	1,00	1,04
31	>64	0,125	nr	>32	0,625	0,125	0,625	>32	1,00	1,07
33	4,00	≤0,03	64	16	0,625	0,06	0,625	0,125	0,65	0,01
34	>64	0,25	nr	>32	1,25	0,125	>5,0	>32	0,51	1,07
40	0,25	0,25	32	16	≤0,156	0,25	2,50	>32	2,62	2,01
41	>64	0,125	nr	>32	0,625	0,25	>5,0	>32	2,00	1,07
43	>64	0,125	nr	>32	0,625	0,125	>5,0	>32	1,05	1,78
44	>64	0,125	nr	>32	0,625	0,125	>5,0	>32	1,01	1,07
45	64	0,125	>64	>32	0,625	0,25	>5,0	>32	2,00	1,15
46	>64	0,25	nr	>32	0,625	0,125	1,25	>32	1,01	1,02
47	>64	0,125	nr	>32	0,625	0,125	0,625	>32	1,01	1,02
48	32	0,125	>64	0,25	0,625	≤0,03	nr	nr	0,26	nr
49	≤0,125	0,125	0,125	0,125	≤0,156	≤0,03	≤0,156	>32	1,48	1,48
50	64	0,125	>64	>32	0,625	0,125	0,625	0,50	1,00	1,02
51	32	0,125	>64	8,00	0,625	0,25	0,625	0,25	2,02	2,04
53	2,00	0,125	8,00	2,00	0,625	0,50	>5,0	>32	4,31	256
54	≤0,125	0,125	≤0,125	0,125	≤0,156	≤0,03	≤0,156	≤0,03	1,48	1,48

Continuação da Tabela 04. Atividade da anfotericina B e do itraconazol quando isolados e associados contra as cepas de agentes da cromoblastomicose*

Amostras	<u>Drogas isoladas (µg/ml)</u>				<u>Drogas associadas (µg/ml)</u>				<u>Índice</u>	
	CIM		CFM		CIM		CFM		CIF	CFF
	AnB	Itra	AnB	Itra	AnB	Itra	AnB	Itra		
55	64	0,125	>64	>32	0,625	0,125	0,625	>32	1,24	1,01
56	1,00	0,125	32	0,125	0,625	0,50	0,625	1,00	4,00	0,13
57	32	0,125	>64	>32	0,625	0,06	>5,0	>32	1,02	1,07
59	1,00	0,125	32	0,25	0,625	≤0,03	0,625	16,0	0,86	64
60	1,00	0,125	32	1,00	0,625	≤0,03	>5,0	>32	1,10	32
62	≤0,125	0,125	32	0,25	≤0,156	≤0,03	>5,0	>32	1,48	128
63	1,00	0,125	>64	0,125	0,625	≤0,03	>5,0	>32	0,86	256
64	0,50	0,125	>64	0,125	≤0,156	0,06	>5,0	128	0,48	64,0
65	8,00	0,125	>64	16,0	0,625	0,06	>5,0	>32	1,07	2,15
66	32	0,125	>64	>32	1,25	0,25	1,25	>32	2,04	1,03
67	32	0,125	nr	0,25	0,625	≤0,03	>5,0	>32	0,26	128
68	1,00	0,125	>64	0,125	0,625	≤0,03	>5,0	>32	0,86	256
69	1,00	≤0,03	32	16	0,625	≤0,03	0,625	>32	1,62	2,02
70	1,00	≤0,03	>64	>32	0,625	≤0,03	>5,0	>32	1,74	1,07
C-1	1,00	≤0,125	>64	>32	0,625	0,125	>5,0	>32	1,62	1,07
C-2	0,50	≤0,125	-	-	≤0,156	0,06	-	-	0,79	-

*AnB: anfotericina B; Itra: itraconazol; CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; CIF: concentração inibitória fracionada; CFF: concentração fungicida fracionária. Os valores das CIMs e CFMs representam a média geométrica dos resultados em triplicada. C-1: cepa controle ATCC 46428, *Fonsecaea pedrosoi* e C-2: cepa controle ATCC 22019 *Candida parapsilose*; nr: não realizado.

Tabela 05. Atividade da anfotericina B e da terbinafina quando isoladas e associadas contra as cepas de agentes de cromoblastomicose*

Amostras	<u>Drogas isoladas (µg/ml)</u>				<u>Drogas associadas (µg/ml)</u>				<u>Índice</u>	
	CIM		CFM		CIM		CFM		CIF	CFF
	AnB	Terb	AnB	Terb	AnB	Terb	AnB	Terb		
19	>64	0,12	nr	0,30	0,625	≤0,04	0,625	0,09	0,34	0,30
20	>64	≤0,04	nr	≤0,04	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	1,00	1,00
22	>64	≤0,04	nr	12	0,625	≤0,04	0,625	12,0	1,00	1,00
23	>64	0,50	nr	3,00	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	0,01	0,02
26	>64	0,12	nr	≤0,04	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	0,34	1,00
27	>64	≤0,04	nr	≤0,04	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	1,00	1,00
28	32	0,18	64	12	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	0,24	0,01
29	>64	≤0,04	nr	≤0,04	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	1,00	1,00
30	>64	≤0,04	nr	≤0,04	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	1,00	1,00
31	>64	≤0,04	nr	≤0,04	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	1,00	1,00
33	4,00	≤0,04	64	0,187	0,625	≤0,04	0,625	0,18	1,15	1,28
34	>64	0,09	nr	0,09	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	0,45	0,45
40	0,25	≤0,04	>32	≤0,04	≤0,156	≤0,04	≤0,156	≤0,04	1,06	1,00
41	>64	≤0,04	nr	≤0,04	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	1,00	1,00
43	>64	0,09	nr	0,187	0,625	≤0,04	0,625	0,18	1,00	1,00
44	>64	0,09	nr	>24	0,625	≤0,04	0,625	0,09	0,45	0,01
45	64	≤0,04	≥64	≤0,04	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	1,00	1,00
46	>64	≤0,04	nr	≤0,04	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	1,00	1,00
47	>64	0,09	nr	0,09	0,625	≤0,04	0,625	0,09	1,00	2,00
48	32	≤0,04	>64	≤0,04	≤0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	1,02	1,00
49	≤0,125	≤0,04	≤0,125	≤0,04	≤0,156	≤0,04	≤0,156	≤0,04	2,24	2,24
50	64	≤0,04	>64	0,09	0,62	≤0,04	0,625	0,75	1,00	8,00
51	32	≤0,04	>64	≤0,04	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	1,01	1,00
53	2,00	0,09	8,00	0,09	C	C	C	C	C	C
54	≤0,125	≤0,04	≤0,125	0,09	C	C	C	C	C	C

Continuação da Tabela 05. Atividade da anfotericina B e da terbinafina quando isoladas e associadas contra as cepas de agentes e cromoblastomicose*

Amostras	Drogas isoladas (µg/ml)				Drogas associadas (µg/ml)				Índice	
	CIM		CFM		CIM		CFM		CIF	CFF
	AnB	Terb	AnB	Terb	AnB	Terb	AnB	Terb		
55	64	≤0,04	>64	0,09	0,625	≤0,04	2,50	0,09	1,00	1,04
56	1,00	≤0,04	nr	≤0,04	0,625	≤0,04	0,625	≤0,09	1,00	2,25
57	32	≤0,04	>64	0,75	0,625	≤0,04	2,50	0,75	1,00	1,04
59	1,00	≤0,04	32	≤0,04	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	1,06	1,01
60	1,00	≤0,04	32	≤0,04	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	1,62	2,27
62	≤0,125	≤0,04	32	≤0,04	≤0,156	≤0,04	≤0,156	≤0,04	2,24	2,25
63	1,00	≤0,04	>64	≤0,04	0,625	≤0,04	0,625	0,09	1,62	2,25
64	0,50	0,09	>64	0,09	≤0,156	≤0,04	≤0,156	≤0,04	0,75	1,00
65	8,00	≤0,04	>64	0,09	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	1,00	1,45
66	32	≤0,04	>64	24,0	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	1,02	1,01
67	32	0,09	nr	0,09	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	1,01	1,03
68	1,00	0,09	>64	0,09	0,625	≤0,04	0,625	≤0,04	1,62	2,25
69	1,00	0,09	32	>32	0,625	≤0,04	0,625	0,09	1,06	2,02
70	1,00	0,09	>64	0,09	0,625	≤0,04	0,625	0,09	1,62	2,00
C-1	1,00	0,187	>64	0,187	0,625	0,187	0,625	≤0,04	0,83	0,22
C-2	0,50	0,37	-	-	≤0,156	≤0,09	-	0,79	-	-

* AnB: anfotericina B; Intra: itraconazol; CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; CIF: concentração inibitória fracionada; CFF: concentração fungicida fracionária. Os valores das CIMs e CFMs representam a média geométrica dos resultados em triplicada. C-1: cepa controle ATCC 46428, *Fonsecaea pedrosoi* e C-2: cepa controle ATCC 22019, *Candida parapsilose*; nr: não realizado; C: contaminação.

Tabela 06. Atividade da anfotericina B e do cetoconazol quando isolados e associados contra as cepas de agentes da cromoblastomicose*

Amostras	<u>Drogas isoladas (µg/ml)</u>				<u>Drogas associadas (µg/ml)</u>				<u>Índice</u>	
	CIM		CFM		CIM		CFM		CIF	CCF
	AnB	Ceto	AnB	Ceto	AnB	Ceto	AnB	Ceto		
19	>64	≤0,125	nr	8,00	0,625	0,25	0,625	8,00	2,00	1,00
20	>64	0,35	nr	0,50	0,625	1,00	0,625	16,0	2,85	32,0
22	>64	0,25	nr	0,50	0,625	1,00	0,625	4,00	4,00	8,00
23	>64	0,25	nr	>32	0,625	0,50	0,625	>32	2,00	1,04
26	>64	0,50	nr	>32	0,625	0,25	0,625	0,50	0,50	0,04
27	>64	≤0,125	nr	>32	0,625	0,125	1,25	>32	2,00	1,08
28	32	1,00	64	>32	0,625	0,125	>5,0	0,50	0,14	0,10
29	>64	≤0,125	nr	>32	0,625	0,25	1,25	>32	2,00	1,05
30	>64	≤0,125	nr	>32	0,625	0,25	0,625	>32	2,00	1,01
31	>64	≤0,125	nr	0,50	0,625	1,00	0,625	4,00	8,00	8,00
33	4,00	0,50	64	0,50	0,625	0,50	0,625	1,00	1,15	2,15
34	>64	1,00	nr	1,00	0,625	0,125	0,625	0,125	0,13	0,13
40	0,25	1,00	>32	>32	≤0,156	0,125	≤0,156	0,25	0,74	0,01
41	>64	0,50	nr	>32	0,625	0,25	0,625	1,00	0,50	0,04
43	>64	0,25	nr	2,00	0,625	0,125	0,625	1,00	0,50	0,50
44	>64	1,00	nr	>32	0,625	0,25	>5,0	>32	0,25	1,07
45	64	0,50	>64	>32	0,625	0,25	0,625	4,00	0,26	0,13
46	>64	0,50	nr	2,00	0,625	0,125	0,625	0,50	0,25	0,28
47	>64	0,50	nr	2,00	0,625	0,125	0,625	0,50	0,26	0,26
48	32	0,50	>64	>32	0,625	0,125	0,625	0,25	0,25	0,02
49	≤0,125	≤0,125	≤0,125	0,125	≤0,156	≤0,06	≤0,156	0,125	1,72	2,24
50	64	≤0,125	>64	0,50	0,625	0,125	0,625	1,00	1,00	2,00
51	32	≤0,125	>64	16,0	0,625	0,125	0,625	4,00	1,02	1,51
53	2,00	≤0,125	8,0	≤0,125	0,625	0,25	0,625	0,25	2,31	2,07
54	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,156	0,06	≤0,156	0,06	1,72	1,73

Continuação da Tabela 06. Atividade da anfotericina B e do cetoconazol quando isolados e associados contra as cepas de agentes da cromoblastomicose*

Amostras	Drogas isoladas (µg/ml)				Drogas associadas (µg/ml)				Índice	
	CIM		CFM		CIM		CFM		CIF	CFF
	AnB	Ceto	AnB	Ceto	AnB	Ceto	AnB	Ceto		
55	64	≤0,125	>64	8,00	0,625	0,125	0,625	1,00	1,00	2,00
56	1,0	≤0,125	nr	1,00	0,625	0,50	0,625	4,00	4,00	4,00
57	32	0,25	>64	0,50	0,625	0,25	0,625	1,00	1,02	2,00
59	1,00	0,50	32	1,00	0,625	0,50	0,625	2,00	1,65	2,01
60	1,00	1,00	32	1,00	0,625	0,50	0,625	2,00	1,12	2,02
62	≤0,125	1,00	32	16,0	≤0,156	0,50	≤0,156	1,00	1,74	1,06
63	1,00	0,50	>64	1,00	≤0,156	0,50	≤0,156	2,00	1,15	2,00
64	0,50	0,50	>64	>32	≤0,156	0,25	≤0,156	2,00	0,81	0,08
65	32	0,25	>64	0,25	0,625	0,125	0,625	0,50	1,57	2,03
66	32	0,35	>64	>32	0,625	1,00	0,625	4,00	2,87	1,25
67	32	0,50	nr	>32	0,625	0,50	0,625	1,00	1,02	1,01
68	1,00	1,00	>64	2,00	≤0,156	1,00	≤0,156	16,0	1,15	8,00
69	1,00	1,00	32	1,00	0,625	0,50	0,625	1,00	0,87	1,04
70	1,00	1,00	32	16,0	0,625	0,25	0,625	1,00	0,87	0,07
C-1	1,00	≤0,125	>64	>32	0,625	0,25	0,625	>32	2,62	0,04
C-2	0,50	0,50	-	-	≤0,156	0,50	-	-	1,31	-

*AnB: anfotericina B; Ceto: cetoconazol; CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; CIF: concentração inibitória fracionada; CFF: concentração fungicida fracionária. Os valores das CIMs e CFMs representam a média geométrica dos resultados em triplicada. C-1: cepa controle ATCC 46428, *Fonsecaea pedrosoi* e C-2: cepa controle ATCC 22019 *Candida parapsilose*; nr: não realizado.

Tabela 07. Atividade da anfotericina B e da 5-fluorocitosina quando isoladas e associadas contra as cepas de agentes da cromoblastomicose*

Amostras	<u>Drogas isoladas (µg/ml)</u>				<u>Drogas associadas (µg/ml)</u>				<u>Índice</u>	
	CIM		CFM		CIM		CFM		CIF	CFF
	AnB	5-FC	AnB	5-FC	AnB	5-FC	AnB	5-FC		
19	>64	>100	nr	nr	0,625	≤0,39	0,625	0,78	0,01	0,01
20	>64	50	nr	nr	0,625	≤0,39	0,625	0,78	0,01	0,02
22	>64	>100	nr	nr	0,625	≤0,39	0,625	0,125	0,07	0,01
23	>64	>100	nr	nr	0,625	12,5	>5,0	50	0,13	0,57
26	>64	>100	nr	nr	0,625	12,5	>5,0	50	0,13	0,57
27	>64	>100	nr	nr	>5,0	>100	>5,0	>100	1,00	1,00
28	32	>100	>64	nr	2,50	5,0	>5,0	>100	0,09	1,78
29	>64	>100	nr	nr	2,50	>100	2,50	>100	1,04	1,04
30	>64	>100	nr	nr	0,625	0,125	2,50	16	0,51	1,04
31	>64	>100	nr	nr	0,625	50	2,50	100	0,51	1,04
33	4,00	100	64	nr	0,625	50	>5,0	>100	0,65	1,07
34	>64	>100	nr	nr	>5,0	>100	>5,0	>100	1,07	1,07
40	0,25	>100	>32	nr	>5,0	>100	>5,0	>100	21	21,0
41	>64	>100	nr	nr	>5,0	>100	>5,0	>100	1,78	1,78
43	>64	>100	nr	nr	0,625	50	>5,0	>100	0,50	1,07
44	>64	>100	nr	nr	>5,0	>100	>5,0	>100	1,07	1,07
45	64	>100	≥64	nr	0,625	>100	0,625	>100	1,00	1,00
46	>64	50	nr	nr	0,625	12,5	1,25	100	0,26	1,00
47	>64	>100	nr	nr	2,50	25	>5,0	>100	0,28	1,07
48	32	>100	>64	nr	2,50	25	>5,0	>100	0,32	1,63
49	≤0,125	≤0,39	≤0,125	≤0,39	≤0,156	≤0,39	≤0,156	0,50	2,24	11,0
50	64	>100	>64	nr	0,625	>100	>5,0	>100	1,01	1,07
51	32	>100	nr	nr	>5,0	>100	>5,0	>100	1,15	1,15
53	2,00	12,5	8,0	>100	>5,0	>100	>100	>100	10,5	10,5
54	≤0,125	≤0,39	≤0,125	25,0	≤0,156	≤0,39	>5,0	0,78	2,24	40,0

Continuação da Tabela 07. Atividade da anfotericina B e da 5-fluorocitosina quando isoladas e associadas contra as cepas de agentes da cromoblastomicose*

Amostras	<u>Drogas isoladas (µg/ml)</u>				<u>Drogas associadas (µg/ml)</u>				<u>Índice</u>	
	CIM		CFM		CIM		CFM		CIF	CFF
	AnB	5-FC	AnB	5-FC	AnB	5-FC	AnB	5-FC		
55	64	>100	8,0	>100	0,625	25	>5,0	>100	0,26	1,62
56	1,00	>100	64	nr	>5,0	>100	>5,0	>100	6,00	6,00
57	32	50	>64	>100	0,625	25	>5,0	>100	0,52	1,07
59	1,00	>100	32	nr	0,625	5,0	>5,0	>100	0,67	1,15
60	1,00	>100	32	nr	>5,0	>100	>5,0	>100	6,00	6,00
62	≤0,125	100	32	nr	>5,0	>100	>5,0	>100	41,0	41,0
63	1,00	>100	>64	>100	0,625	≤0,39	2,50	≤0,39	0,62	1,04
64	5,0	>100	>64	nr	2,50	0,78	>5,0	25,0	5,00	32,0
65	8,0	50	>64	nr	0,625	25,0	>5,0	>100	0,57	1,07
66	32	>100	>64	nr	2,50	100	>5,0	>100	1,14	1,0
67	32	100	nr	nr	0,625	≤0,39	>5,0	>100	0,02	1,07
68	1,00	>100	>64	nr	0,625	≤0,39	>5,0	100	0,62	1,07
69	1,00	>100	32	nr	0,625	25,	>5,0	50	0,87	5,50
70	1,00	>100	>64	nr	>5,0	>100	>5,0	>100	6,00	6,00
C-1	1,00	>100	>64	nr	>5,0	>100	>5,0	>100	6,00-	6,00
C-2	0,50	0,25	-	-	≤0,156	1,25	-	-	5,31	-

*AnB: anfotericina B; Ceto: cetoconazol; CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; CIF: concentração inibitória fracionada; CFF: concentração fungicida fracionária. Os valores das CIMs e CFMs representam a média geométrica dos resultados em triplicada. C-1: cepa controle ATCC 46428, *Fonsecaea pedrosoi* e C-2: cepa controle ATCC 22019 *Candida parapsilose*; nr: não realizado

Tabela 08. Atividade da anfotericina B e do fluconazol quando isolados e associados contra as amostras da cromoblastomicose*

Amostras	<u>Drogas isoladas (µg/ml)</u>				<u>Drogas associadas (µg/ml)</u>				<u>Índice</u>	
	CIM		CFM		CIM		CFM		CIF	CFF
	AnB	Fluco	AnB	Fluco	AnB	Fluco	AnB	Fluco		
19	>64	>128	nr	nr	>5,0	2,00	>5,0	>128	0,09	1,07
20	>64	>128	nr	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,07	1,07
22	>64	>128	nr	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,07	1,07
23	>64	>128	nr	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,07	1,07
26	>64	>128	nr	nr	1,25	>128	>5,0	>128	1,02	1,07
27	>64	>128	nr	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,07	1,07
28	32	>128	>64	nr	>5,0	128	>5,0	>128	1,15	1,07
29	>64	>128	nr	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,07	1,07
30	>64	>128	nr	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,07	1,07
31	>64	>128	nr	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,07	1,07
33	4,00	>128	64	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,07	1,07
34	>64	>128	nr	nr	0,625	64	>5,0	128	0,51	1,07
40	0,25	128	>32	>128	>5,0	8,00	>5,0	>128	20,0	2,00
41	>64	>128	nr	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,07	1,07
43	>64	>128	nr	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,07	1,07
44	>64	>128	nr	nr	>5,0	64	>5,0	128	1,07	1,07-
45	64	>128	>64	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,07	1,07
46	>64	128	nr	nr	2,50	>128	2,5	128	1,04	1,04
47	>64	>128	nr	nr	2,50	>128	>5,0	>128	1,04	1,07
48	32	>128	>64	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,15	1,15
49	≤0,125	0,50	≤0,125	nr	≤0,156	0,50	>5,0	128	2,24	41,0
50	64	>128	>64	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,07	1,07
51	32	>128	>64	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,15	1,15
53	2,0	>128	8,0	>128	>5,0	>128	>5,0	>128	3,50	1,62
54	≤0,125	0,50	≤0,125	1,00	≤0,156	2,00	≤0,156	4,00	5,24	5,24
55	64	64	8,0	>128	2,50	64	>5,0	64	1,00	1,12

Continuação da Tabela 08. Atividade da anfotericina B e do fluconazol quando isolados e associados contra as amostras da cromoblastomicose*

Amostras	Drogas isoladas (µg/ml)				Drogas associadas (µg/ml)				Índice	
	CIM		CFM		CIM		CFM		CIF	CFF
	AnB	Fluco	AnB	Fluco	AnB	Fluco	AnB	Fluco		
56	1,0	>128	>64	nr	0,625	64	0,625	>128	0,51	2,00
57	32	64	>64	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	2,15	2,15
59	1,00	>128	32	nr	>5,0	16	>5,0	>128	5,12	5,15
60	1,00	>128	32	nr	0,625	32	>5,0	>128	0,29	1,15
62	≤0,125	>128	32	nr	≤0,156	32	>5,0	>128	1,50	2,15
63	1,00	32	>64	>100	0,625	32	2,50	0,50	1,62	1,29
64	0,50	128	>64	nr	0,25	128	0,25	>128	1,50	1,50
65	8,0	64	>64	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,56	2,00
66	32	>128	>64	nr	5,0	128	>5,0	>128	1,15	1,15
67	32	>128	nr	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,15	1,15
68	1,00	64	>64	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	7,00	1,07
69	1,00	>128	32	nr	5,0	128	>5,0	>128	6,00	1,07
70	1,00	>128	>64	nr	>5,0	64	>5,0	>128	6,00	1,07
C-1	1,00	64	>64	nr	>5,0	>128	-	-	4,07	-
C-2	0,50	8,0	-	-	≤0,156	1,25	-	-	2,31	-

*AnB: anfotericina B; fluco: fluconazol; CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; CIF: concentração inibitória fracionada; CFF: concentração fungicida fracionária. Os valores das CIMs e CFMs representam a média geométrica dos resultados em triplicada. C-1: cepa controle ATCC 46428, *Fonsecaea pedrosoi* e C-2: cepa controle ATCC 22019 *Candida parapsilose*; nr: não realizado.

Tabela 09. Atividade da anfotericina B e da griseofulvina quando isoladas e associadas contra as amostras da cromoblastomicose*.

Amostras	<u>Drogas isoladas (µg/ml)</u>				<u>Drogas associadas (µg/ml)</u>				<u>Índice</u>	
	CIM		CFM		CIM		CFM		CIF	CFF
	AnB	Griseo	AnB	Griseo	AnB	Griseo	AnB	Griseo		
19	>64	16	nr	nr	0,625	0,50	1,25	32	0,04	2,00
20	>64	64	nr	nr	0,625	64	>5,0	>128	1,00	1,07
22	>64	32	nr	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	1,00	1,07
23	>64	64	nr	>128	0,625	32	32	>128	0,50	1,50
26	>64	1,0	nr	128	0,625	32	>5,0	>128	32,0	128
27	>64	16	nr	>128	0,625	0,50	1,25	64	1,00	4,02
28	32	64	>64	>128	0,625	32	>5,0	>128	0,52	2,15
29	>64	64	nr	nr	>5,0	>128	>5,0	>128	2,07	2,07
30	>64	64	nr	>128	0,625	0,50	1,25	64	0,01	0,52
31	>64	32	nr	>128	0,625	32	>5,0	>128	2,00	2,07
33	4,00	64	64	nr	0,625	64	>5,0	>128	1,15	1,07
34	>64	64	nr	nr	0,625	64	>5,0	>128	1,00	2,07
40	0,25	32	32	nr	≤0,156	0,50	>5,0	>128	0,63	1,01
41	>64	32	nr	nr	0,625	64	>5,0	>128	2,00	4,07
43	>64	64	nr	nr	0,625	64	>5,0	>128	1,01	1,07
44	>64	>128	nr	nr	0,625	32	>5,0	>128	0,26	1,07
45	64	64	nr	Nr	0,625	32	>5,0	>128	1,51	1,07
46	>64	16	nr	>128	0,625	16	>5,0	32	1,00	1,07
47	>64	32	nr	nr	0,625	32	>5,0	32	1,00	1,33
48	32	64	>64	nr	0,625	64	>5,0	>128	1,01	1,01
49	≤0,125	16	≤0,125	>128	≤0,156	0,50	≤0,156	4,0	1,27	1,27
50	64	64	>64	nr	0,625	64	>5,0	>128	1,50	1,07
51	32	16	nr	nr	0,625	32	>5,0	>128	1,01	1,07
53	2,0	64	8,0	nr	0,625	16	>5,0	>128	0,56	1,62

Continuação da Tabela 09. Atividade da anfotericina B e da griseofulvina quando isoladas e associadas contra as amostras da cromoblastomicose*

Amostras	Drogas isoladas (µg/ml)				Drogas associadas (µg/ml)				Índice	
	CIM		CFM		CIM		CFM		CIF	CFF
	AnB	Griseo	AnB	Griseo	AnB	Griseo	AnB	Griseo		
54	≤0,125	0,50	≤0,125	nr	≤0,156	0,50	1,25	64	2,24	10,5
55	64	64	8,0	nr	0,625	0,50	0,625	>128	1,01	1,07
56	1,00	>128	nr	nr	0,625	64	>5,0	>128	1,12	1,14
57	32	>128	>64	nr	0,625	128	>5,0	>128	1,02	1,07
59	1,0	>128	32	nr	0,625	64	>5,0	>128	1,12	1,15
60	1,0	64	32	nr	0,625	64	>5,0	>128	1,64	1,15
62	≤0,125	>128	32	nr	≤0,156	4,0	>5,0	>128	1,23	1,15
63	1,0	64	>64	>128	0,625	8,0	>5,0	>128	0,75	1,07
64	0,50	8,0	>64	>128	≤0,156	4,0	>5,0	>128	0,52	1,00
65	8,0	64	1,00	>128	0,625	64	>5,0	>128	1,07	2,15
66	32	>128	>64	128	0,625	64	>5,0	64	0,52	1,57
67	32	>128	nr	nr	0,625	64	5,0	>128	0,52	1,00
68	1,0	64	>64	nr	0,625	2,0	>5,0	>128	1,15	1,15
69	1,0	16	32	>128	>5,0	64	>5,0	8,0	7,62	13,0
70	1,0	64	>64	nr	>5,0	>128	>5,0	128	8,07	7,00
C-1	1,0	64	>64	nr	>5,0	64	>5,0	>128	5,50	1,07
C-2	0,5	16	-	-	≤0,156	64	-	-	4,31	-

*AnB: anfotericina B; Griseo: griseofulvina ; CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; CIF: concentração inibitória fracionada; CFF: concentração fungicida fracionária. Os valores das CIMs e CFMs representam a média geométrica dos resultados em triplicada. C-1: cepa controle ATCC 46428, *Fonsecaea pedrosoi* e C-2: cepa controle ATCC 22019 *Candida parapsilose*; nr: não realizado.

Quadro 01. Dados gerais dos pacientes com amostras sequenciais

pacientes	iniciais	gênero	idade	profissão	suposto local de aquisição	localização anatômica	gravidade	duração da doença
1	AMJ	Feminino	64	do lar	Minas Gerais	MI-D*	grande	02 anos
2	OAS	Masculino	72	lavrador	Minas Gerais	MI-D	moderada	13 anos
3	JZN	Masculino	51	agricultor	Rondônia	MI-D	moderada	12 anos
4	JMC	Masculino	61	agricultor	Ceará	MI-D	moderada	10 anos
5	MFS	Masculino	70	agricultor	Bahia	MI-D	moderada	10 anos
6	OP	Masculino	69	lavrador	Rondônia	MI-D	grande	04 anos
7	AJO	Feminino	60	doméstica	Pernambuco	MI-E**	pequena	06 meses

*MI-D: membro inferior direito; **MI-E: membro inferior esquerdo

Quadro 2. Dados clínicos dos pacientes com amostras sequenciais

amostras	pacientes	terapia atual	data das coletas	aspectos clínicos
	AMJ			
19		itra	26/08/97	nódulos múltiplos ulcerados
27		itra	02/12/97	aumento número de lesões
29		itra	02/04/98	melhora do quadro clínico
30		itra	07/04/99	piora do quadro clínico
	OAS			
20			26/08/97	placas e nódulos
22		itra	30/09/97	melhora clínica
31		itra+crio	28/04/98	recidiva
50		itra+crio	25/04/99	aumento número de lesões
55		itra	14/10/99	lesões ativas
57		itra	06/07/00	lesões ativas
65		itra+terb	10/10/00	lesões ativas
69		itra	09/01/01	quadro estabilizado
70		itra	20/03/01	discreta piora
	JZN			
26		itra + crio	12/12/97	placas e nódulos verrucosos
41		itra+crio	03/09/98	lesões ativas
45		itra	00/02/99	lesões ativas
	JMC			
43		20d+crio	08/12/98	lesão ativa
46		itra	27/04/99	piora do quadro clínico
47		itra	25/05/99	melhora do quadro clínico
	MFS			
48			25/05/99	nódulos ulcerados
51		itra+crio	29/06/99	lesões ativas
66		itra+crio	22/10/00	discreta melhora
	OP			
56			00/08/99	formações nodulares
60		itra	08/08/00	melhora na exudação e odor
63		itra+terb	14/09/00	discreta melhora
68		itra	07/11/00	discreta melhora
	AJO			
64			13/09/00	ulcera crostosa
67		itra+crio	14/11/00	piora da lesão

	Terapia vigente	Data das coletas	cepa	CIM AnB	CIM Itra	CIM Terb	CIM Ceto	CIM 5FC	CIM Fluco	CIM Griseo	CFM AnB	CFM Itra	CFM Terb	CFM Ceto	CFM 5-FC	CFM Fluco	CFM Griseo
	itra+crio	03/09/98	41	>64	0,125	≤0,04	0,50	>100	>128	32,0	nr	>32	≤0,04	>32	nr	nr	nr
	itra	/02/99	45	>64	0,125	≤0,04	0,50	>100	>128	64	>64	>32	≤0,04	>32	nr	nr	nr
4	20d/itra	08/12/98	43	>64	0,125	0,09	0,25	>100	>128	64	nr	>32	0,187	2,0	nr	nr	nr
	itra	27/04/99	46	>64	0,25	≤0,04	0,50	50	>128	16	nr	>32	≤0,04	2,0	nr	nr	>128
	itra	25/05/99	47	>64	0,125	0,09	0,50	>100	>128	32	nr	>32	0,09	2,0	nr	nr	nr
5		25/05/99	48	32	0,125	≤0,04	0,50	>100	>128	16	<64	0,25	≤0,04	>32	nr	nr	nr
	itra	29/06/99	51	32	0,125	≤0,04	≤0,125	>100	>128	16	>64	8,00	≤0,04	16	nr	>128	>128
	itra+crio	22/10/00	66	32	0,125	≤0,04	0,35	>100	>128	>128	>64	32	24	>32	nr	nr	nr
6		-/08/99	56	1,0	0,125	≤0,04	≤0,125	>100	>128	64	32	0,125	≤0,04	1,0	nr	nr	nr
	Itra+terb	08/08/00	60	1,0	0,125	≤0,04	1,0	>100	>128	64	32	0,125	≤0,04	1,0	nr	nr	nr
	itra	14/09/00	63	1,0	0,125	≤0,04	0,50	>100	64	64	>64	0,125	≤0,04	1,0	12,5	nr	nr
	itra+crio	07/11/00	68	1,0	0,125	0,09	1,0	100	64	64	>64	0,125	0,09	2,0	nr	nr	nr
7		13/09/00	64	0,5	0,125	≤0,04	0,50	>100	128	32	>64	0,125	≤0,04	32	nr	128	>128
	itra+crio	14/11/00	67	32	0,125	0,09	0,50	>100	>128	>128	>64	0,25	0,09	32	nr	nr	nr

* AnB: anfotericina B; itra: itraconazol; fluco: fluconazol; 5-FC: 5-fluorocitosina; terb: terbinafina; ceto: cetoconazol; erio: cricicirurgia; nr: não realizado; CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima

Tabela 11. Concentração inibitória fracionária e concentração fungicida fracionária de diversos antifúngicos frente as cepas isoladas de amostras sequenciais de pacientes com cromoblastomicose*.

	Terapia vigente	Data das coletas	cepa	CIF AnB+	CIF AnB+ Itra	CIF AnB+ Terb	CIF AnB+ Ceto	CIF AnB+ 5-FC	CIF AnB+ Fluco	CIF AnB+ Griseo	CFF AnB+ Itra	CFF AnB+ Terb	CFF AnB+ Ceto	CFF AnB+ 5-Fc	CFF Anb+ fluco	CFF AnB+ griseo
1		26/08/97	19	0,5	0,34	2,00	2,00	0,01	0,09	0,04	0,04	0,30	1,00	0,01	1,07	2,00
	itra	02/12/97	27	2,00	0,34	2,00	2,00	1,00	1,07	1,00	1,62	1,00	1,08	1,00	1,07	4,02
	itra	02/04/98	29	2,00	1,00	2,00	2,00	1,04	1,07	2,00	1,62	1,09	1,05	1,04	1,07	2,07
	itra	07/04/97	30	1,00	1,00	2,00	2,00	0,51	1,07	5,00	1,04	1,00	1,01	1,04	1,07	0,52
2		26/08/97	20	0,24	1,00	2,85	2,85	0,01	1,07	1,00	1,01	1,00	32,0	0,02	1,07	1,07
	itra	30/09/97	22	1,00	1,00	4,00	4,00	0,07	1,07	1,00	1,00	1,00	8,00	0,01	1,07	1,07
	itra+crio	28/04/98	31	1,00	1,00	8,00	8,00	0,51	1,07	2,00	1,07	1,00	8,00	1,04	1,07	2,07
	itra	25/04/99	50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,07	1,50	1,01	1,00	2,00	1,07	1,07	1,07
	itra+crio	14/10/99	55	1,24	1,00	1,00	1,00	0,26	1,00	1,01	1,01	1,04	2,00	1,62	1,12	1,07
	itra	06/07/00	57	1,02	1,00	1,00	1,00	0,52	2,00	1,02	1,07	1,04	2,00	1,07	2,00	1,07
	itra+terb	10/10/00	65	1,07	1,00	1,57	1,57	0,57	1,56	1,07	2,15	1,45	2,03	1,07	1,56	2,15
	itra	09/01/01	69	1,62	1,06	0,87	0,87	0,87	6,00	7,62	2,02	2,02	1,04	5,50	1,05	13,0
	itra	20/03/01	70	1,62	1,62	0,87	0,87	6,00	6,00	6,00	1,07	2,00	0,07	6,00	1,07	7,00
3		12/12/97	26	2,00	0,34	0,50	0,50	0,13	1,02	32,0	2,00	1,00	0,04	0,59	1,07	128

	Terapia vigente	Data das coletas	cepa	CIF AnB+	CIF Terb	CIF AnB+	CIF Ceto	CIF 5-FC	CIF AnB+	CIF Fluco	CIF Anb+	CIF Griseo	CFF Itra	CFF AnB+	CFF Terb	CFF Ceto	CFF AnB+	CFF 5-FC	CFF Anb+	CFF fluco	CFF AnB+	CFF griseo
	itra+crio	03/09/98	41	2,00	1,00	0,50	1,78	1,07	1,07	2,0	1,07	2,0	1,07	1,00	0,04	1,78	1,07	1,07	1,07	1,07	4,07	
	itra	/02/99	45	2,01	1,00	0,26	1,01	1,07	1,07	1,51	1,07	1,51	1,15	1,00	0,13	1,00	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	
4	20d/itra	08/12/98	43	1,05	1,00	0,50	0,50	1,07	1,07	1,01	1,07	1,01	1,78	1,00	0,50	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	
	itra	27/04/99	46	1,01	1,00	0,25	0,26	1,07	1,07	1,00	1,07	1,00	1,02	1,00	0,28	1,00	1,04	1,00	1,04	1,07	1,07	
	itra	25/05/99	47	1,01	1,00	0,26	0,28	1,04	1,04	1,00	1,04	1,00	1,02	2,25	0,26	1,07	0,32	1,07	0,32	1,33	1,33	
5		25/05/99	48	0,26	1,02	0,27	0,32	1,15	1,15	1,01	1,15	1,01	nr	1,00	0,01	1,63	1,15	1,15	1,15	1,01	1,01	
	itra	29/06/99	51	2,02	1,01	1,02	1,15	1,15	1,15	1,01	1,15	1,01	2,04	1,00	1,25	1,15	1,15	1,15	1,15	1,07	1,07	
	itra+crio	22/10/00	66	2,04	1,02	2,87	1,14	1,15	1,15	0,52	1,15	0,52	1,04	1,00	1,25	1,07	1,15	1,15	1,15	1,57	1,57	
6	itra+terb	-/08/99	56	4,62	1,00	4,62	6,00	0,51	0,51	1,12	0,51	1,12	256	2,25	4,00	6,00	1,00	1,00	1,00	1,14	1,14	
	itra	08/08/00	60	0,86	1,06	1,12	6,00	0,29	0,29	1,64	0,29	1,64	64	1,01	2,02	6,00	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	
	itra	14/09/00	63	0,86	1,62	1,15	0,62	1,69	1,69	0,75	1,69	0,75	256	2,25	1,00	1,04	1,69	1,69	1,69	1,07	1,07	
	itra+crio	07/11/00	68	0,26	1,62	1,15	0,62	7,00	7,00	0,65	7,00	0,65	256	2,25	1,00	1,07	1,07	1,07	1,07	1,00	1,00	
7		13/09/00	64	0,48	0,75	0,81	0,62	1,50	1,50	0,52	1,50	0,52	64	1,00	0,08	1,04	1,50	1,50	1,50	1,00	1,00	
	itra+crio	14/11/00	67	0,26	1,01	1,02	0,02	1,15	1,15	0,52	1,15	0,52	128	1,03	1,01	1,07	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	

* AnB: anfotericina B; itra: itraconazol; 5-FC: 5-fluorocitosina; terb: terbinafina; ceto: cetoconazol; crio: cricirugia; nr: não realizado; CIF: concentração inibitória fracionária; CFF: concentração fungicida fracionária.

DISCUSSÃO

De modo geral, os pacientes que sofrem de cromoblastomicose apresentam algumas características em comum, como observado no presente trabalho. Assim, entre os indivíduos estudados, predominaram os indivíduos do sexo masculino, o que está de acordo com relatos da literatura pertinente (CASTRO, 1998). Também em concordância com esta, a maioria dos pacientes pesquisados referiu ocupação voltada a agricultura, com constante contato com plantas e solo. Pesquisando-se os históricos dos pacientes, entre os Estados de origem, onde se suspeita que tenha ocorrido a infecção, destacam-se Minas Gerais, Rondônia, Pernambuco e Bahia.

Em quase todos os pacientes a localização das lesões era mais freqüente nos membros inferiores, confirmando a prevalência podal dessa micose. Apenas 3 pacientes apresentaram lesão em outras áreas corpóreas, um com lesão nas nádegas (paciente 11), um no antebraço (paciente 13) e um com lesão na mão e braço direito (paciente 14).

A presença de células muriformes, com ou sem presença de hifas demáceas, observadas ao exame direto das amostras dos pacientes, é comum em casos positivos da doença em questão (RIPPON, 1982; HARADA, 1983; MCGINNIS, 1983). Quanto a identificação das cepas isoladas (Tabela 1), verificou-se compatibilidade com os resultados de autores que relatam elevada freqüência de *Fonsecaea pedrosoi* em casos de cromoblastomicose (AL DORRY, 1972; CASTRO, 1998; QUEIROZ-TELLES et al, 1997; SILVA et al, 1992; SILVA et al, 1999). Em um estudo com 71 pacientes apresentando cromoblastomicose no estado do Paraná, entre 1985 e 1996, 94,3% dos casos o agente identificado foi *F. pedrosoi*

(HOOG et al, 2000). O estudo desse e de outros agentes etiológicos da cromoblastomicose pode proporcionar um amplo campo para novas descobertas, uma vez que, até o momento, pouco se sabe sobre eles. Entre outros aspectos, pesquisas mais profundas possibilitariam maior esclarecimento quanto a nomenclatura, ainda muito discutida entre autores, assim como ao desenvolvimento dos mesmos.

Com o advento dos poliênicos e, posteriormente, dos derivados azólicos, ativos contra fungos, modificou-se o perfil do tratamento das micoses, até então limitado à aplicação de diversos compostos químicos de atividade desconhecida. Esses novos medicamentos de elevada especificidade e de ação imediata possibilitaram ampliar-se a terapia para uma variedade de micoses, além de se elucidar o prognóstico de muitas destas infecções que representavam um verdadeiro flagelo para o paciente (GRAYBILL et al, 1992; LACAZ et al, 1991; LACAZ et al, 1998; ROGERS, 2001; ODDS, 1988).

No entanto, a medida que a utilização desses medicamentos foi se ampliando, começaram ser observados efeitos indesejáveis em alguns casos e fracassos em outros. Os fungos invasores, com variações individuais de espécie, desenvolveram recursos para resistir aos novos medicamentos. Assim, espécies de *Candida* e de outros fungos que inicialmente se mostraram sensíveis aos antifúngicos poliênicos e azólicos, passaram a resistir a ação dos mesmos e a transmitir esta característica as gerações sucessivas (MEDOFF et al, 1980; SPELLER et al, 1985).

Pacientes neutropênicos, diabéticos, queimados, transplantados, além de outros imunocomprometidos, e os recém nascidos, estão predispostos à aquisição de micoses. Em vista de fatores pouco conhecidos, novos aspectos dessas infecções têm sido relatados. Micose antes sensível à ação terapêutica dos antifúngicos deixam de responder a alguns tratamentos. Em adição, micose antes raras, tornaram-se mais frequentes e novos patógenos começaram a ser descritos. (ARMSTRONG, 1993; GALLAGHER et al, 1992; GRADON et al, 1992; HOPFER, 1992; KEISER et al, 1992; MEUNIER et al, 1992; NIELSEN et al, 1990).

As propostas de associações de antifúngicos entre si ou com outras substâncias, idealizadas para uma tentativa de melhor eficácia e mais ampla aplicabilidade em tratamentos, têm surtido efeito em alguns casos, mas falhado em outros (BARRET et al, 1992; BENNETT et al, 1979; BRAJTBURG, 1982; COSGROVE, 1978; GRAYBILL, 1992; MEUNIER, 1992; MEYER, 1992; MIKAMI et al, 1992; PETROU et al, 1991).

A vantagem da quimioterapia associada é a redução da incidência do surgimento de cepas resistentes durante o tratamento; menor dose e/ou duração da terapia, em conseqüência, menor risco de toxicidade para o paciente, sem perda de eficácia clínica; espectro mais amplo de atividade contra infecções polimicrobianas, e sinergia (PETROU et al, 1991). Outra aplicação da terapia combinada diz respeito a minimização de efeitos colaterais causados por antifúngicos (BODEY, 1966; HOPFER, 1992).

O uso da terapia associada para infecções bacterianas é comum na prática clínica, principalmente em pacientes imunocomprometidos (PETROU

et al, 1991; VAN DER AUWERA, 1992). Em infecções fúngicas, essa conduta é rara, visto que os estudos relacionados são restritos. A principal associação descrita é entre AnB e 5-FC, inicialmente referida como sinérgica (MEDOFF et al, 1972). A partir de diversos estudos, porém, passou a ser relatada como aditiva, por diversos autores (BENNETT, 1977; DUPONT et al, 1979; POLAK, 1980). Por outro lado, um estudo feito em pacientes imunocomprometidos utilizando associação de fluconazol com 5-fluorocitosina contra meningite, mostrou uma diminuição significativa de severa dor de cabeça nos pacientes após um mês de tratamento, comparando-se com a monoterapia (MAYANJA-KIZZA et al, 1998).

Várias publicações que descrevem sinergia entre drogas antifúngicas são baseadas em critérios amplos para determinar interações favoráveis (ODDS, 1982). No entanto, para considerar a viabilidade do uso de associações de drogas, cujas interações *in vitro* são sinérgicas, aditivas e/ou indiferentes, é necessário saber se a concentração de cada uma das drogas é passível de ser alcançada no soro, ou no líquido cefalorraquiano, e se o potencial de toxicidade foi reduzido (GROLL et al, 2002; ODDS, 1982). Alguns estudos *in vitro* mostram que as associações podem ser sinérgicas, mas a concentração de uma ou ambas as drogas é clinicamente inviável (ODDS, 1982).

A associação de drogas leva a três resultados possíveis: sinergismo, antagonismo e indiferença. A associação é considerada sinérgica quando tem como resultado um efeito claramente benéfico, caracterizado pela potencialização do efeito esperado de um ou de ambos os antifúngicos

prescritos, sendo o resultado final maior do que a simples soma dos efeitos esperados dos componentes da associação. A associação antagônica é caracterizada quando o efeito é menor do que a soma do efeito de cada um dos antifúngicos da combinação. Portanto, neste caso, a utilização do fármaco isolado proporcionaria eficácia maior. Na associação indiferente ou aditiva os componentes não sofrem interferência; cada fármaco exerce sua atividade como se estivesse atuando isoladamente (FONSECA, 1991).

Quanto aos métodos utilizados para testes de sensibilidade para fungos filamentosos, os que utilizam técnicas de diluição em caldo, recomendadas pelo NCCLS, vêm sendo estudadas de modo mais amplo. A partir desses estudos, alguns autores sugerem modificações nas condições do teste incluído no documento M-38A daquela instituição e sua incorporação a uma nova versão desse documento. De qualquer modo, ainda não se sabe se os resultados desses testes servem para prever os resultados clínicos (ESPINEL-INGROFF et al, 2000).

No presente trabalho, estudou-se o perfil de sensibilidade de agentes da cromoblastomicose frente a antifúngicos, isolados e associados, pela técnica de diluição em ágar (SOARES et al, 1993; SOARES et al, 1998). Embora técnicas de diluição em caldo sejam preconizadas pelo NCCLS (1992, 1997) para testes com leveduras e fungos filamentosos, as mesmas não abrangem fungos demáceos. Além disso, a técnica considerada clássica, macrodiluição em caldo, é bastante trabalhosa e não permite o estudo concomitante de várias cepas. A microdiluição em caldo foi avaliada por Rex (1993) como capaz de proporcionar resultados duvidosos e de difícil

leitura. A técnica de diluição em ágar, preferida por outros autores (SILVA, 1992; SOARES et al, 1993; SOARES et al, 1998; YOSHIDA et al, 1997), favorece a execução do teste com um número elevado de cepas, é de fácil leitura e proporciona aeração para o fungo, com risco relativamente menor de desidratação do meio quando se requer incubação acima de 72 horas. Essa técnica é considerada, por alguns autores, como a mais apropriada para fungos demáceos (BEDOUT et al, 1997; CERMEÑO-VIVAS et al; 1997; CORRADO et al, 1982; MCGINNIS et al, 1998; MCGINNIS et al, 1998; RESENDE et al, 1997).

Com base em constantes estudos desenvolvidos em nosso laboratório e nos fatores acima referidos, optou-se pela técnica de diluição em ágar para o desenvolvimento deste trabalho. Os resultados obtidos para a curva de crescimento, foram compatíveis com os relatados em estudo anterior (ANDRADE, 1999). Nestas condições, a idade dos cultivos para a preparação do inóculo foi de 14 dias (a 30°C), visto que incluía um número de células vegetativas e germinativas proporcionais. O meio, yeast nitrogen base (YNB) foi o meio selecionado para o uso no teste devido a sua composição química conhecida, adequada para o desenvolvimento dos fungos (SHADOMY ET AL, 1991). Resultados similares aos do presente trabalho foram obtidos por Corrado (1982), que também realizou teste de sensibilidade em meio YNB para AnB e 5-FC, entre outros antifúngicos. Segundo esse autor é necessário identificar o gênero e a espécie do fungo, cuja sensibilidade a drogas está sendo determinada (CORRADO, 1982). Essa conclusão também foi alcançada em outro estudo de interações

resultantes de associação da AnB e azólicos contra *Candida albicans* e *C. tropicalis* (CURY, 1994).

No presente trabalho, os resultados obtidos para a cepa controle com a técnica de diluição em ágar foram compatíveis com os relatados por outros autores que empregaram técnicas consideradas de referência (PFALLER et al, 1995; REX et al, 1996), o que deu confiabilidade aos testes realizados.

Primeiramente, verificou-se o perfil de sensibilidade das amostras aos antifúngicos isoladamente. Os resultados obtidos destacaram a elevada resistência das mesmas a AnB, de tal modo que, em concentrações $\leq 2,0\mu\text{g/ml}$, esse poliênico não demonstrou atividade fungistática frente a 77% dos isolados e não foi fungicida para 95% deles. Embora considerada rara, a ocorrência de resistência a AnB já foi descrita em algumas leveduras (SANGLARD et al, 1995; HE et al, 1994) e em bolores (MCGINNIS, 1998; MOORE; 2000). Essa resistência pode estar associada a diversos fatores, incluindo a ausência da molécula alvo da AnB na célula fúngica. Alguns autores consideram que nem todos os fungos apresentam ergosterol na membrana celular (GOMES, 1992), o que impediria o principal mecanismo de ação da AnB. Outro componente que pode estar envolvido na resistência é a melanina (ALVIANO, 1991), um pigmento, antioxidante natural, presente na parede fúngica que protege a célula contra a ação de espécies reativas de oxigênio e outros fatores (SCHNITZLER et al, 1999; WALSH et al, 2000; WHERLER et al, 1988). Esse componente pode ter ação oxidante para a anfotericina B proporcionando a desnaturação da mesma. Recentemente, alguns autores descreverem duas cepas de *Candida albicans* resistentes ao

fluconazol e a anfotericina B que apresentavam uma alteração em sítio de ação diferente do ergosterol, ou seja, uma mutação na síntese de 14 alfa-metilergosterol, (FRANZ et al, 1998). Além disso, vários estudos descrevem um aumento na frequência de cepas de *Candida* spp resistentes a anfotericina B (CANUTO; RODERO, 2002; COLLIN et al, 1999, WALMSLEY, 2001).

Estudos relacionados à secreção enzimática, divisão celular e funções metabólicas estão sendo reavaliados e comparados entre diferentes agentes etiológicos (LOFTSSON; BREWSTER, 1996)

Uma vez que os fatores de virulência dos fungos estão relacionados a patogenicidade dos mesmos (HOOG, 2000), aqueles reconhecidamente associados à virulência, como a aderência e a produção de exoenzimas, e o de descrição mais recente, a melanina (LOFTSSON; BREWSTER, 1996), representam novos desafios para a terapia antifúngica.

Embora alguns desses fatores possam ter interferido na ação da AnB, quando isolada, contra a maioria das cepas em estudo, os mecanismos relacionados a potencialização desse poliênico, quando associado, requerem estudos mais amplos para sua compreensão. Avanços da biologia molecular, incluindo a avaliação seqüencial do genoma, podem fornecer novas informações sobre sítios de ação e permitir importantes descobertas para a terapia antifúngica (WALSH et al, 2000).

O itraconazol tem demonstrado ser uma droga de escolha importante para substituir a anfotericina B, principalmente em pacientes que apresentam neutropenia, infecções por *Aspergillus* spp ou por fungos

demáceos, ou em casos de falha no tratamento de cromoblastomicose com AnB (MCGINNIS, 1983; WHEELER et al, 1987).

A complexidade para se determinar as cepas como sensíveis ou resistentes ao itraconazol torna os achados bastante divergentes (PFALLER et al, 2000; SZEKELY et al, 1999). Segundo o artigo de revisão realizada por Odds, (1988), consideram-se cepas com reduzida sensibilidade, aquelas comparadas a outras de uma mesma espécie, avaliadas em uma mesma técnica e no mesmo laboratório. Esse conceito pode ser aplicado neste estudo.

No presente trabalho, os valores de CIMs desse fármaco foram similares aos observados por outros autores (ANDRADE, 1999; BEDOUT et al, 1997; MCGINNIS et al, 1998). Em concentrações $\leq 0,5\mu\text{g/ml}$, o itraconazol foi fungistático para todos os isolados. Entretanto, não exerceu ação fungicida contra cerca de 75% deles, um achado similar ao de Andrade (1999).

Na literatura pesquisada, são raros os relatos de resistência a esse azol. Esta pode estar relacionada a componentes celulares, que podem variar de cepa para cepa. Artigos de revisão referem a ocorrência de resistência de leveduras ao itraconazol (ESPINEL-INGROFF, 1997; VANDER BOSSCHE et al, 1998), e um trabalho mostrou que esse azol *in vitro* apresentava forte atividade contra *Candida* spp (GROLL, 2001), porém clinicamente isto não ocorreu. O itraconazol tem sido utilizado no tratamento da cromoblastomicose e embora para alguns pacientes tenha sido observada melhora clínica, as recidivas têm sido freqüentes (BONIFAZ et

al, 1997; BOPP, 1976; CASTRO, 1992; DE CLEQCQ et al, 1985; ESTERRE et al, 1997; KULLAVANIJAYA et al, 1995; LOPES et al, 1979; QUEIROZ-TELLES et al, 1992; LOPES et al, 1992; YU, 1995).

Frente as cepas em estudo, as associações entre itraconazol e AnB resultaram em interações sinérgicas, indiferentes ou antagônicas, sendo que 43,5 % foram caracterizadas por interações indiferentes.

Outros estudos de interação AnB-itraconazol, mas contra uma variedade de fungos, mostraram, *in vivo* e *in vitro*, a ocorrência também de antagonismo e indiferença (SUGAR, 1995). Segundo Sugar (1995), é possível que o itraconazol induza a depleção do ergosterol na parede celular fúngica, teoricamente reduzindo a viabilidade dos sítios de ação da AnB. Isto possibilitaria a diminuição na probabilidade de atividades sinérgicas e, em casos mais severos, resultaria no antagonismo da atividade da AnB.

Esses eventos não explicam, porém, os resultados obtidos no presente trabalho. Neste caso, a associação foi altamente eficaz na potencialização da AnB, mas não do azol. As interações observadas podem ser explicadas com base nas pequenas variações de concentração sofridas pelo itraconazol quando associado ao poliênico. Comparadas as do azol isolado, as CIMs ou as CFMs da droga combinada praticamente não sofreram modificações. Frente a uma mesma cepa, diferenças de até quatro vezes nos valores dessas concentrações podem ser esperadas em repetidas provas de sensibilidade que utilizam técnicas de diluição seriada e não invalidam esses testes (ODDS, 1982). Também há controvérsias quando a interação itraconazol e anfotericina B. Scheven e Schewegler, 1995,

sugerem que azóis lipofílicos, como o itraconazol, antagonizam a ação da anfotericina B, mas os azóis hidrofílicos, como o fluconazol, não produzem esse efeito. Esses autores consideram que o antagonismo ocorre devido ao acúmulo de componentes lipofílicos na membrana fúngica (SCHEVENS, 2000). Experimentos *in vivo* com candidíase e aspergilose confirmam antagonismo nesta interação (SUGGAR, 1998; STEVENS et al, 2000).

A terbinafina, um antifúngico da classe das alilaminas, foi ativa em concentrações $\leq 1,5\mu\text{g/ml}$, inibindo o crescimento de 100% dos isolados. Esse resultado é compatível com o obtido por outros autores (MCGINNIS et al, 1998). Entretanto, sua ação fungicida ocorreu contra menor número de isolados, alcançando cerca de 84,5% dos mesmos. Mesmo assim, esse antifúngico mostra boas perspectivas para o tratamento da cromoblastomicose, uma observação compatível com os achados de outros autores (ESTERRE et al, 1996b). Esterre et al (1996a), estudando pacientes com cromoblastomicose causada por *Fonsecaea pedrosoi* ou por *C. carrionii* em Madagascar, conseguiram bons resultados a partir da administração de terbinafina. Além disso, acredita-se que os fungos filamentosos sejam mais sensíveis a terbinafina do que as leveduras (RYDER, 1992). Alguns dos pacientes incluídos no presente trabalho começaram a receber terbinafina para tratamento da cromoblastomicose. Entretanto, os resultados desse procedimento ainda não se encontraram disponíveis, mas sabe-se que para alguns pacientes a ocorrência de intolerância gástrica levou à suspensão da droga. Além disso, o alto custo do tratamento é outro fator a ser considerado para uso em ampla escala.

Na literatura encontram-se resultados considerados satisfatórios com o uso da associação de terbinafina com AnB e/ou triazóis contra *Candida albicans* (BARCHIESI, 1998; RYDER et al, 1998). Verificou-se que a interação entre AnB e terbinafina nas primeiras 24 horas foi sinérgica, passando a indiferente após esses período (BARCHIESI, 1998). No presente trabalho, essa associação demonstrou resultados similares aos obtidos para a associação AnB-itraconazol, mostrando que a monoterapia com o azol ou com a alilamina poderia ser mais indicada que as referidas combinações.

Um estudo recente no tratamento de cromblastomicose, causada por *Fonsecaea pedrosoi*, realizado no Brasil, sugere um tratamento alternando o uso de itraconazol e da terbinafina por semanas. Como o itraconazol apresenta meia vida no plasma de aproximadamente 21,5 horas e a terbinafina apresenta eliminação bifásica com meia vida de 22 e 90 horas, haveria uma ação continuada de droga na lesão cutânea de cromblastomicose . Outros estudos utilizando o itraconazol e terbinafina associados obtiveram efeito de sinergismo frente a *Candida albicans* (BARCHIESI, 1997), *Aspergillus fumigatus* (OAKLEY et al, 1997) ou a isolados de *Scedosporium prolificans* (MELETIADIS, 2000).

A associação entre terbinafina e itraconazol representa uma combinação de diferentes classes químicas de antifúngicos com diferentes alvos na célula do microrganismo. Exemplo clássico de interação sinérgica entre dois antibacterianos de diferentes ações é a associação entre trimetropim e sulfonamidas; cada antibacteriano exerce individualmente sua atividade em pontos seqüenciais no metabolismo do folato. As alilaminas e

os triazóis inibem a biossíntese do ergosterol bloqueando diferentes vias. Os triazóis inibem o citocromo P-450 através da enzima lanosterol 14- alfa demetilase e a terbinafina pela enzima esqualeno epoxidase. A terbinafina, além de causar a deficiência de ergosterol, produz um acúmulo intracelular de esqualeno, o que danifica a membrana celular fúngica. Com base nesses conhecimentos, seria altamente indicada a realização de pesquisas com a combinação desses antifúngicos contra fungos demáceos.

O cetoconazol também apresentou resultados satisfatórios, inibindo o crescimento dos isolados em estudo em concentrações $\leq 8\mu\text{g/ml}$. Entretanto, foi incapaz de exercer ação fungicida contra 43,5% das cepas nessas concentrações.

Embora recomendado principalmente para o tratamento de leveduroses, alguns autores obtiveram bons resultados em estudos com o cetoconazol contra fungos filamentosos (CORRADO, 1982) e mesmo no tratamento da paracoccidioidomicose (HAHN; HAMDAM, 2000) e da cromoblastomicose (CUCÉ, 1980). No entanto, são poucos os relatos sobre o uso desse azol em micoses subcutâneas. Este fato se deve a necessidade de um tratamento prolongado para essas infecções, uma condição que submeteria o paciente aos importantes efeitos colaterais da droga. O cetoconazol pode causar hepatotoxicidade, entre outras anomalias, e seu uso deve ser limitado.

Quanto a associação entre AnB e cetoconazol, alguns autores acreditam que o poliênico antagonize a atividade antifúngica do azol (GUPTA, 1994a). Essa ação foi observada apenas em alguns casos no

presente trabalho, onde, frente a maioria dos isolados, houve interação indiferente entre esses antifúngicos. Mesmo assim, uma análise mais minuciosa dos resultados obtidos mostra que ocorreram variações nas CIMs e CFMs de ambos antifúngicos, similares às observadas nas combinações da AnB com o itraconazol ou com a terbinafina.

A 5-fluorocitosina foi amplamente utilizada no tratamento de candidíases e algumas micoses sistêmicas, mas o grande número de relatos de casos de resistência tornou desaconselhável a monoterapia com essa droga (CUENCA-ESTRELLA et al, 2001; KANTARCIOGLUN; YUCEL, 2002). No entanto, foram relatados resultados promissores com o uso de associações entre AnB e 5- FC, sobretudo no tratamento da criptococose.

No presente trabalho, porém, essa associação não foi eficaz na potencialização das drogas frente a maioria dos isolados. Embora tenham ocorrido interações sinérgicas e indiferentes, essas nem sempre foram obtidas em concentrações das drogas passíveis de serem alcançadas no soro.

O fluconazol representa, sem dúvida, um marco no tratamento das infecções causadas por leveduras, sobretudo em pacientes imunocomprometidos (FRANZ et al, 1998; GUNSILIUS, 2001). Seu extenso uso, porém, tem mostrado resultados pouco satisfatórios, como a indução de resistência clínica e celular (LIEBOWITZ et al, 2001; LOPEZ et al, 2001; MIYAZAKI et al; 1998; OROZCO, et al 1998). Também tem sido descrita a ocorrência de resistência intrínseca ao fluconazol, não só em leveduras (GUNSILIUS et al, 2001; MODON, 1999; LIEBOWITZ et al, 2001;

KOVACICOVA et al; 2001), mas principalmente em fungos filamentosos (DIAZ et al, 1992). Resultados compatíveis com esses últimos achados foram obtidos no presente trabalho, verificando-se que em concentrações $\leq 8,0\mu\text{g/ml}$ o fluconazol foi fungistático somente para duas das 39 amostras estudadas. Sua associação à AnB foi pouco eficaz na potencialização das drogas em concentrações passíveis de serem alcançadas no soro, embora contra a maioria dos isolados a interação entre as drogas tenha sido indiferente.

Alguns autores consideram que o fluconazol tem efeito satisfatório quando associado a doses baixas de AnB, porque, nessas condições, não se verifica antagonismo entre essas drogas (SUGAR et al, 1995; SANATI et al, 1997). Ao contrário, outro estudo realizado com modelos murinos com candidíase, o antagonismo foi observado quando se utilizou o fluconazol e a AnB associados (LOUIE et al, 1990). Embora vários experimentos com modelos animais continuem sendo estudados nas interações de drogas ou no uso seqüencial das mesmas para tratamento de micoses invasivas, as tentativas de padronização do modelo experimental tem mostrado uma variedade de resultados conflitantes (STEVENS et al, 2000).

A griseofulvina, um antifúngico considerado eficaz no tratamento de dermatofitoses tem sido pouco estudada como droga de primeira linha ou alternativa no tratamento de outras micoses. Frente as cepas em estudo, esse antifúngico, isolado ou associado a AnB, foi menos eficaz do que o itraconazol ou a terbinafina.

A eficácia de um tratamento está simultaneamente ligada as condições físicas e imunológicas dos pacientes, ao tipo de infecção, grupo de risco e na escolha do tratamento a ser administrado (CASTRO, 1998). O quadro 1 mostra que na maioria dos pacientes com acompanhamento clínico e micológico, a doença se manifestou entre a 3ª e 4ª décadas de vida. Não se sabe se este fato estaria relacionado à inoculação tardia do agente, decorrente do exercício das atividades ocupacionais rurais na vida adulta, ou se a inoculação seria precoce e o tempo de desenvolvimento da doença longo. A raridade de casos de cromoblastomicose em crianças e adolescentes, que desde a mais tenra idade se acidentam em contato com o solo ou plantas reforça a segunda hipótese. Entre esses sete pacientes, a principal ocupação relacionava-se à agricultura, com exceção de dois do sexo feminino. As duas donas de casa informaram que, por morarem no interior, com frequência realizavam serviços em contato com plantas, solo e animais. Como na maioria das séries de casos estudados na América Latina (BONIFAZ et al, 1997), houve predomínio da doença em indivíduos do sexo masculino

Muitos pacientes apresentavam outras doenças não relacionadas à cromoblastomicose, como hipertensão arterial, diabetes, cardiopatias. O paciente número 5 implantou um marcapasso após sete meses de tratamento e o número 2 apresentava com frequência, infecções bacterianas associadas as lesões da micose.

A modalidade terapêutica utilizada para tratamento da cromoblastomicose nos pacientes com amostras sequenciais consistiu no

uso oral de itraconazol associado ou não a criocirurgia ou a terbinafina. Entretanto, os aspectos clínicos das lesões expressaram a dificuldade de se tratar a doença (Quadro 2), um achado compatível com o de outros autores (BOLZINGER et al, 1991; CASTRO, 1998). Os critérios utilizados para definir se um paciente está curado ou não são bastante conflitantes, e podem envolver aspectos imunológicos (CASTRO, 1998). Também abrangem problemas como dificuldade para obter amostra significativa, necessidade de tratamento e acompanhamento prolongados e a refratariedade da doença aos mais variados métodos terapêuticos, sendo pouco freqüente a cura total. Alguns autores preconizam que a palavra cura em cromoblastomicose possa ser aplicada após cinco anos do término do tratamento, sem que ocorram recaídas (BOLZINGER et al, 1991). Castro (1988) admite que o período de três anos de acompanhamento seja suficiente para considerar um paciente curado (CASTRO, 1998). Em nosso estudo, mesmo o paciente número 2 com maior tempo de tratamento, em torno de quatro anos não pode ser considerado curado, em vista da doença recidivante.

Em concentrações $\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$, o itraconazol foi fungicida para todas as amostras dos pacientes sob acompanhamento e fungicida apenas para as recuperadas dos pacientes 6 e 7 (Tabela 10). Com base nos perfis de sensibilidade estabelecidos, pode-se considerar que esses isolados foram sensíveis ao itraconazol, respondendo a $\text{CIM} \leq 0,5 \mu\text{g/ml}$ doazol. Entretanto, confrontando-se os valores de CIMs para cada cepa com o aspecto clínico da lesão na data da coleta (Tabela 10 e Quadro 2), verifica-se que, de modo geral, a $\text{CIM} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, sempre representou piora do

quadro clínico, enquanto que as CIMs de 0,06 a 0,125 µg/ml refletiram uma melhora ou estabilização do quadro clínico, mas não cura da doença. Nessas condições, é possível inferir que, embora o pico sérico do itraconazol seja de 0,5 µg/ml, a concentração máxima na lesão deve alcançar cerca de 0,125 µg/ml nos pacientes que apresentam melhora clínica. Assim, o ponto de corte para se considerar uma cepa como sensível ao itraconazol corresponderia, possivelmente, a CIMs do azol < 0,06 µg/ml, com boas perspectivas de cura clínica e micológica. Além disso, a sensibilidade de um isolado a CIM = 0,25 µg/ml (ou maior) do azol poderia refletir resistência inata ou adquirida da amostra em questão ao itraconazol.

Aquisição de resistência foi descrita por Andrade et al (2003) em cepas seqüenciais recuperadas de pacientes tratados com itraconazol, as quais responderam a CIMs mais elevadas desse azol do que as inicialmente isoladas. Esses autores também observaram correlação entre esses resultados e a ausência de resposta a terapia ministrada.

Pelo exposto, consideramos que este estudo deve ser ampliado, incluindo o acompanhamento de pacientes até comprovação de cura clínica e micológica após terapia com itraconazol ou outro recurso terapêutico.

Pesquisas adicionais com cetoconazol e principalmente com terbinafina também poderiam contribuir para o tratamento da cromoblastomicose. Ambos foram fungistáticos para as amostras seqüenciais em concentrações passíveis de serem alcançadas no soro e, nessas concentrações, a terbinafina foi também fungicida para a maioria dos isolados em estudo. Além disso, em vista da importância atualmente

atribuída ao estudo de terapia combinada (STEVENS et al, 2000) e dos resultados obtidos no presente trabalho, a reavaliação das associações entre a AnB e outros antifúngicos, assim como o estudo de outras combinações, poderiam fornecer resultados mais promissores incluindo-se nos testes concentrações mais baixas desses fármacos.

CONCLUSÃO

Em relação às amostras:

- A identificação dos isolados mostrou a elevada frequência de *Fonsecaea pedrosoi* em casos de cromoblastomicose, em nosso meio.

Em relação à técnica utilizada:

- A técnica de diluição em ágar apresentou condições favoráveis e reprodutividade para execução dos testes de sensibilidade com os agentes da cromoblastomicose. Favoreceu a avaliação de um número elevado de cepas, foi de fácil leitura e proporcionou boa aeração para o crescimento do fungo.

Em relação aos perfis de sensibilidade:

- Comprovou-se que a associação entre AnB e outro antifúngico pode resultar na potencialização de uma ou ambas as drogas frente a fungos demáceos. Isoladamente, a AnB não mostrou atividade antifúngica frente a maioria dos isolados.
- De modo geral, o itraconazol foi fungistático, mas não fungicida para os isolados. Sua associação a AnB mostrou interações aditivas ou indiferentes frente a maioria das cepas.
- As 39 amostras estudadas foram sensíveis a terbinafina nos testes de CIM e 84,5% foram sensíveis nos testes de CFM, mostrando boas perspectivas para o tratamento da cromoblastomicose. A associação

com AnB demonstrou resultados satisfatórios, mas que requerem estudos mais amplos.

- Todas as amostras foram sensíveis a ação fungistática do cetoconazol. Este foi incapaz de exercer ação fungicida contra 43,5% das amostras, e sua associação com a AnB mostrou resultados similares aos obtidos para AnB combinada ao itraconazol ou a terbinafina.
- A associação de AnB e 5-FC não foi eficaz na potencialização das drogas frente à maioria dos isolados.
- Todas as amostras foram resistentes a griseofulvina. E somente uma cepa respondeu ao fluconazol. A associação desses fármacos com a AnB mostrou resultados menos satisfatórios que os obtidos nas associações do poliênico com a terbinafina ou com o itraconazol.

Em relação às amostras sequenciais:

- Com base nas CIMs do itraconazol e nos aspectos clínicos das lesões foi possível evidenciar um ponto de corte para esse antifúngico em casos de cromoblastomicose.
- Dependendo da droga associada a AnB e da cepa em estudo, foram obtidos alguns resultados satisfatórios para a execução de estudos mais amplos como as associações entre anfotericina B com itraconazol e a terbinafina

Referências Bibliográficas

ABERNATHY, R.S. Treatment of systemic mycoses. *Medicine*, v.52, p.385-394, 1973.

AL-DORRY, Y. *Chromomycosis*. Missoula.: Mountain Press, 1972, 203p.

ALVIANO, C.S.; FARBIARZ, S.R.; SOUZA, R.W.; ANGLUSTER, J.; TRAVASSOS, L.R. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melan. *J. Gent. Microbiol.*, Colchester, V.137, p.837-844, 1991.

ALVES, S.H.; CURY, A.E. Estudo comparativo entre as técnicas de diluição em caldo e diluição em ágar nos antibiogramas para *Candida*. *Ver. Inst. Méd. Trop. São Paulo*, v.34, p.259-265, 1992.

ANDRADE, T.S., CASTRO, L.G.M.; NUNES, R.S.; GIMENES, V.M.F; CURY, A.E. Susceptibility of sequencial *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses*, Berlin (em publicação).

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

ALLER, AI.; MARTIN-MAZUELOS, E.; LOZANO, F.; GOMEZ-MATEOS, J.; STEELE_MOORE, L.; HOLLOWAY, W.J.; GUTIÉRREZ, M.J; RECIO, F.J.; ESPINEL-INGROFF, A. Correlation of fluconazol MICs with clinical outcome in *Cryptococcal* infection. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, p.1544-1548, 2000.

ARANGO, M. ; JARAMILO, C. ; CORTÉS, A; RESTREPO, A . Auricular chomoblastomycosis caused by *Rhinocladiella aquaspersa*. *Med. Mycol.* , Plymouth, v.32, p. 43-45, 1998.

ARMSTRONG, D. Treatment of opportunistic fungal diseases. *Rev. Infect. Dis.*, Chicago, v.1, p.1-9, 1993.

BAILY, G.; PERRY, F.; DENING, D. et al: *Fluconazol- resistant candidosis* in an HIV cohort. *AIDS*, v.8, p.787-789, 1994.

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.

BARCHIESI, F.; DI FRANCESCO, L.F.; COMPAGNUCCI, D. A.; GIACOMETTI, A.; SCALISE, G. In vitro interacción of terbinafina with amphotericin B, fluconazole and itraconazole against clinical isolates of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemotherapy*, v.41, p.59-65, 1998.

BARRET, J. F; KLAUBERT, D. H. Recent advances in antifungal agents. *Annu. Rep. Med. Chem.*, Whashington, v.27, p.149-158, 1992.

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

BENNETT, J. E. Fármacos antimicrobianos. In: Handernan, 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.

BENNETT, J. E. Antifungal agents. In: Mandell, G.L.; Bennett, J. E.; Dolin, R. *Principles and pratic of infectious diseases*. 4. ed. New York: Chuchill Livigstone, 1995, cap.31, v.1, p.401-410.

BENNETT, J. E. Flucytosine. *Ann. Inter. Med.* Philadelphia, v.86, p. 319-322, 1977.

.BENNETT, J.E.; DISMUKES, W.E.; DUMA, R.J.; MEDOFF, G.; SANDE, M.A.; GALLIS, H.; LEONARD, J.; FIELDS, B.T.; BRADSHAW, M.; HAYWOOD, H.; MC GEE, Z.A.; CATE, T.R.; COBBS, C.G.; WARNER, J.F.; ALLING, D.W. A comparison of amphotericin b alone and combined with flucytosine in treatment of cryptococcal meningitis. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.301, p. 123-131, 1979.

BITTENCOURT, A.L.; LONDERO, A.T.; ANDRADE, J.F. .Chromoblastomycose auricular. Relato de um caso. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.36, n.4 , p.381-384, 1994.

BLANK, H, REBELL, G. Thiabelndazole activity against the fungi of dermatophytosis, mycetoma and chromomycosis. *J. Invest. Dermatol*, v.44, p. 219-22, 1965.

BONIFAZ,A; MARTINEZ-SOTO, CARRASCO-GERARD, E.; PENICHE, J. Treatment of chomoblastomycosis with itraconazol, cryosurgery, and combination of both. *Int. J. Dermatol*, Philadelphia, v.36, p542-547, 1997.

BOPP, C. Cura da cromoblastomycose por novo método de tratemnto. *Méd. Cut. I. L. A*, v.4, p.285-292, 1976.

BOPP, C. New method for the treat ment of chomoblastomycosis. In: FOURTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE MYCOSES. Brasília, 1978. *The black and white yeast*. Washington. Pan. Am. Health Organ. Sci. Publ. N.356, p.33-3

BORELLI, D. A clinical trial of itraconazol in the treatment of deep mycoses and leishmaniais. *Rev. Infect. Dis. Chigago*, v.9, supl.1, p.57-63, 1987.

BODEY, G. P. Fungal infections complicating acute leukemia. *J. Chronic. Dis.*, Oxford, v.19, p.667-687, 1966.

BODY, G. P. Topical and systemic antifungal agents. *Med. Clin. Of North. America*, Houston, v.72, n.3, p.637-659, 1988.

BOLZINGER, T. PRADINAUD, R, SAINTE- MARIE, D. DUPONT, B, CHWETZOFF, E. Traitement de quatre cas de chromomycoses à *Fonsecaea pedrosoi* par l' association 5-fluorocytosine- itraconazole. *Nouv Dermatologiques*, v.10, p.462-466, 1991.

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

BRAJTBURG, J.; KOBAYASHI, D.; MEDOFF, G.; KOBAYASHI, G.S. Antifungal action of amphotericin B in combination with other polyene or imidazole antibiotics. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.146, p.138-146, 1982.

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

BRYCE, E. A.; ROBERTS, F. J.; SEKHON, A.S.; COLDMAN, A. J. Yeast in blood cultures. Evaluation of factors influencing outcome. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, New York, v.15, p.233-237, 1992.

BLOCK, E. R.; JENNINGS, A. E.; BENNETT, J.E. 5-Fluorocytosine resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agent. Chemothe*, v.3, p.349-656, 1973.

BURKS, J.B.; WAKABONGO, M.; MCGINNINS, 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.

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

CAMPOS MAGALHÃES, M.J.; MEYER, H.A. Dez casos de cromoblastomicose em Moçambique. In: 1º CONG. INT. DERMAT. JOHANNESBURG, 1970, p1-6.

CARRIÒN, A.L.; SILVA-HUTNER, M. Taxonomic criteria for the fungi of chromoblastomycosis with reference to *Fonsecaea pedrosoi*. *Int. J. Derm.* V.10. p.35-46, 1971. Apud: AL-DOORY, Y. *Chromomycoisi*.i Missoula: Mountain Press, 1972, 203p.

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

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).

CARLSON, M.A.; CONDON, R.E. Nephrotoxicity of amphotericin B. *J. Am. College Surg*, v.179, p.361-381, 1994.

CARTLEDGE, J. MIDGLEY, J.; GAZZARD, B. Itraconazol cyclodextrin solution: the role of *in vitro* susceptibility testing in predicting successful treatment of HIV-related fluconazol-resistant and fluconazole-susceptible oral candidosis. *AIDS*, v.11, p.163-168, 1997.

CANUTO, M.M.; RODERO, G.F. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Infect. Dis.*, v.2, p550-563, 2002.

CHANDLER, F. W.; KAPLAN, W.; AJELLO, L. *A colour atlas and textbook of the histopathology of mycotic diseases*. London, Wolfe Med, p.47-49, 1980.

CHANG, M.R.; CURY, A.E. Amphotericin B- metronidazole combination against *Candida* spp. *Rev. Ibero. Micol.*, Bilbao, v.15, p.78-80, 1998.

CERMEÑO- VIVAS, J. R.; TORRES- RODRIGUES, J. M. Susceptibility test of dematiaceous fungi with broth macro and microdilution and ETES. IN: 13. CONG. INT. HUM. MYCOL.- ISHA, Parma, 1997. Abstr. p.203.

COLLIN, B; CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H. Antifungal resistance in non-albicans *Candida* species. *Drug. Resist. Updat.*, v.2, n.1, p.9-14, 1999.

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.

COSGROVE, R.F.; BEEZER, A. E.; MILES, R.J. *In vitro* studies of amphotericin B in combination with the imidazole antifungal compounds clotrimazole and miconazole. *J. Infect. Dis.* Chicago, v.138, p.681-685, 1978.

CUCÈ, L.C.; WROCLAWSKI, E.L.; SAMPAIO, S.A.P. Treatment of paracoccidioidomycosis, candidiasis, chromomycosis, lobomycosis and mycetoma with ketoconazole. *Int J. Dermatol.*, v.19, p.405-408, 1980.

CUEVA-PAZ, S. A. Reporte de caso tratado com anfotericina B intralesional. *Dermatología (Mex)*, v.13, p.139-146, 1969. Apud: LACAZ, C.S.; PORTO, E. C. Cromomicose. IN: 8 ed. São Paulo: Savier, 1991, p. 376-386.

CUENCA- ESTRELA,M.; DIAZ-GUERRA, T.M.; MELLADO, E. RODRÍGUEZ-TUDEL, J.L Flucytosine primary resistance in *Candida* species and *Cryptococcus*. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.*, v.20,n.4, p.276-279, 2001.

CURRIE, B; GHANNOUM, M.; BESSEN, L.; et al. Decreased fluconazole susceptibility of a relapse *Cryptococcus neoformans* isolate after fluconazole treatment. *Infect. Dis. Clin., Pract*, v.4, p.318-319, 1995.

CURY, A. E. Interações resultantes de associação da anfotericina B com fármacos azólicos e haloacetaminas contra isolados de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. São Paulo, 1994, 121p.(Tese apresentada ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Livre Docente)

CURY, A.E; HIRSCHFELD, M.P.M. Interactions between amphotericin B and nitroimidazoles against *Candida albicans*. *Mycoses*, Berlin, v.40, p. 187-192, 1997.

DAVEY, K.G.; SZEKELY, A.; JOHNSON, E.M.; WARNOCK, D.W. Comparison of new commercial colorimetric microdilution method with a standard method for *in-vitro* susceptibility testing of *Candida* spp and *Cryptococcus neoformans*. *J. Antimicrob. Chemother*, v.42, p.439-444, 1998.

DENNING,D.W.; VENKATESWARLU, K.; OAKLEY, K.L. et al. itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents. Chemother*, v.41, p.1364-1368, 1997a.

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

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 zaïrois à *Fonsecaea pedrosoi* . *Ann. Soc. Belge Méd. Trop*, v.65, p.95-97, 1985.

DE MARIE, S.; JANKENEGT, R.; BAKKER WOUDEMBERG, I.A .J.M. Clinical use of liposomal and lip-complexed amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother*, v.33. p.907-916, 1994.

DE MURI, G.P; HOSTETTER, M. Resistance to antifungal agents. *Antimicrob. Res. Ped.*, v.42, n.3, 1995.

DIAZ, M.; NEGRONI, R.; MOMTERO-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*, Chicago. v.14, suppl.-1, p.68-76, 1992.

DIXON, D. M.; POLAK-WYSS, A.The medically important dematiaceous fungi and their identification. *Mycoses*, Berlin, v.34, p.1-18, 1991.

DOLLERY, C., ed. Therapeutic Drugs-Amphotericin B. London: Potter, Churchill livingstone. p.113-116, 1991a.

DOLLERY, C.; ed. Therapeutic Drugs-Ketoconazole. London: Churchill livingstone-v.2.PT1, 1991c, p.21-24.

DOLLERY, C.; ed. Therapeutic Drugs-Flucytosine. London: Churchill livingstone, , p.44-46, 1991b.

DOLLERY, C.; ed. Therapeutic- Drugs- Fluconazole. London: Churchill livingstone-supl.1, p.90-94, 1992a.

DOLLERY, C.; ed. Therapeutic- Drugs-Itraconazol. London: Churchill livingstone-supl 1., p.114-119, 1992b.

DOLLERY, C.; ed. Therapeutic- Drugs-Terbinafina. London: Churchill livingstone-Supl.2, p.243-247, 1992c.

DRUTZ, D.J. Rapid infusion of amphotericin B: is it safe, effective and wise?. *Am. J. Med.*, v.93, p.119-121, 1992.

DUPONT, B; DROUHET, E. *In vitro* synergy and antagonism of antifungal agents against yast-like fungi. *Postgrad. Med. J.*, Oxford, v.55, p.683-686, 1979.

ESPINELL- INGROFF, A. Clinical relevance of antifungal resistance. *Infect. Dis. Clin. North Amer.* Washington, v.11, p.929-944, 1997.

ESPINELL-INGROFF, A; WARNOCK, D.W.; VASQUEZ, J.A & ARTHINGTON-SAGGS. *In vitro* antifugal susceptibility methods and clinical implications of antifugal resistance. *Medical Mycology*,v.38, suppl.1, p.293-304, 2000.

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. *Medica Mycology*. Glasgow, Polonelli, L. ° and Wlsh, T. J. 1998, v.36, supl.1. p.68-78.

ESPINELL-INGROFF, A; BARLETT, M.; BOWDEN, R et al. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungals susceptibility testing of filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol*, v.35, p.139-146, 1997.

ESPINEL-INGROFF, A.; DAWSON, K.; PFALLER, M. A.; ANAÏSSIE, E.; BRESLIN, B.; DIXON, D.; FOTHERGILL, A.; PAETZNICK, V.; PETER, J.; RINALDI, M.; WLASH, T. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* Washington, v.39, p.314-319, 1995.

ESPINELL-INGROFF, A.; KERKERING, T.M. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi. *J.Clin. Microbiol.*, v.35, p.139-143, 1997.

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.

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, 1996a .

ESTERRE, P.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A ; RAHARISOLO, C. Histoire naturelle de chromoblastomycosis à Madagascar et dans l'océan indien. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Paris*, v.90, p.312-317, 1997.

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, suppl.46, p.33-36, 1996b.

FRANCO, L.; GOMEZ, I.; RESTREPO. Saperconazole in the treatment of systemic and subcutaneous mycoses. *Int. J. Dermatol.* Philadelphia, v.31, p.725-729, 1992.

FRANZ, R.; KELLY, S.L.; LAMB, D.C.; KELLY, D.E.; RUHNKE, M.; MORSCHHAUSER, J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise

development of fluconazol resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* Washington, v.42, p.3065-3072, 1998.

FIELDING, R.M.; SINGER, A.W; WANG, L.H.; BABBAR, S.; GUO, L.S. Relationship of pharmacokinetics and drug distribution in tissue to increased safety of amphotericin B colloidal dispersion in dogs. *Antimicrob. Agents Chemother*, v.36, p.299-307, 1992.

FINQUELIEVICH, J.L.; ODDS, F.C.; QUEIROZ-TELLES; WHEAT, L.J. New advances in antifungals treatment. *Medical Mycology*, v.38, supl. 1, p.317-322, 2000.

FONSECA, A. L. *Antibióticos da clínica médica*. 4. ed. Rio de Janeiro: EPUME, 1991, 514p.

FURTADO, M.S.S; Comportamentos de dermatófitos “in vitro” frente a griseofulvina e derivados imidazólicos. São Paulo, 1991 (Tese de Mestrado-Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

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

GARNER, A.; ARATHOON, E.; STEVENS, D. A. Initial experience in therapy for progressive mycoses with itraconazol, the first clinically studied triazole. *Rev. Infect. Dis.*, Chicago, v.22, supl.2, p.161-165, 1987.

GALLAGHER, P. J.; BENNETT, D.E.; HENMAN, M.C.; RUSSEL, R.J.; FLINT, S.R.; SHANLEY, D.B.; COLEMAN, D.C. Reduced azole susceptibility of oral isolates of *Candida albicans* from HIV-positive patients and a derivative exhibiting colony morphology variation. *J.Gen. Microbiol.* Colchester, v.138, p.1901-1911, 1992.

.GIRMENIA, C.; MARTINO, P.; DE BERNARDIS, F. et al. Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of the causative strains. *Clin. Infect. Dis*, v.23, p.506-514, 1996.

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.

GOETTE, D; ROBERTSON, D. Transepithelial elimination in chromomycosis. *Arch. Dermatol*, v. 120, p. 400-401, 1984.

GOLD.W., et al. Amphotericin A nB, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. *In vitro studies. Antibiotics Annual-1955-1956*. New York, Medical Encyclopedia, p.579-586, 1956.

GOMEZ-LOPEZ, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. In vitro susceptibility of clinical isolates of Zygomycota to amphotericin B, flucytosine, itraconazole and voriconazole *J. Antimicrob. Chemother*, v.48, n.6, p.919-921, 2001.

GRADON, J.D.; TIMPONE, J.G.; SCHNITTMAN, S. M. Emergence of unusual opportunistic pathogens in AIDS: a review. *Clin. Infect.Dis*, Chicago, v.15, p.134-157, 1992.

GRAYBILL, J.R. FUTURE directions of antifungal chemotherapy. *Clin. Infect. Dis*, Chicago, v.14, supl 1. p. 170-S181, 1992.

GROLL, A. H.; WALSH. Antifungal chemotherapy advances and perspectives. *Swiss. Med. Wkly*, v.132, 303-311, 2002.

GUNSILUIS, E.; FLORL, C; KAHLER, C.M.; GASTL, G.; PETZER, A L.; *Candida ciferrii*, new fluconazole-resistant yeast causing systemic mucosis in immunocompromised patients. *Ann. Hematol.*, v.80, n.3, 178-179, 2001.

GUPTA, A.K.; SAUDER, D.N.; SHEAR, N.H. Antifungal agents: An overview. Part I. *J. Am. Acad. Dermatol.*; v.30, p.677-698, 1994a.

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, 1994b.

GUPTA, A.K.; SHEAR, N.H. Pharmacokinetics and pharmacology of terbinafina and itraconazole. *J.Am. Acad. Dermatol.*; St. Louis, v.38, p.42-47, 1998.

GUPTA, A. K.; SHEAR, N.H. Terbinafina: an update. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis, v.37, p.979-988, 1997.

HARADA, S.; KUSUNOKI, T. Scanning electron microscopic observation of the parasitic forms of *Fonsecaea pedrosoi* in human skin lesion. *Mycopathologia*. The Hague, v.82, p33-37, 1983.

HARRISON T.S.; NONG, S; LEVITZ, S.M.; Induction of human immunodeficiency virus type 1 expression in monocytic cells by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *J.Infect. Dis*, v.176, p.485-491, 1997.

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

HAN, R.C.; HAMDAM, J.S.; Effects of amphotericin B and three azole derivatives on the lipids of yeast cells of *Paracoccidiodes brasiliensis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, p.1997-2000, 2000.

.HE, X.; TIBALLI, R.; ZARINS, L. et al: Azole resistance in oropharyngeal *Candida albicans* strains isolated from patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother*, v.38, p.2495-2497, 1994.

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. KANO, K. Über die chromoblastomykose durch einen noch nicht als Pathogen beschriebenen Pilz: *Hormiscim dermatitidis* n. Sp. *Arch. Derm. Syph. Berl*, v.179, p.282-294, 1937. Apud: AL-DOORY, Y. Chromomycosis. Missoula: Mountain Press, 203p, 1972.

HOEPRICH, P.D. Clinical use of amphotericin B and derivatives: lore, mystique and fact. *Clin. Infect. Dis.* Chicago, v.14, suppl.1, pS114-s119, 1992

HOPFER, R.L. Amphotericin B resistant *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* Chicago, v.165, p.761-764, 1992.

KANTARCIOGLU, A.S; YÜCEL, A. A flucytosine-resistant *Cryptococcus neoformans* (serotype D) strain isolated in Turkey from cutaneous. *Med. Mycol*, v.40, p519-523, 2002.

KENNEDY, M.S; DEEG, H.J.; SIEGEL, M.; CROWLEY, J.J.; STORB, R. THOMAS; E. D. Acute renal toxicity with combined use of amphotericin B and cyclosporine after marrow transplantation. *Transplantation*, v.35, p.211-215, 1983.

KEISER, P.; KEAY, S. Candidal pancreatic abscesses: report of two cases and review. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago, v.14, p.884-888, 1992.

KOBAYASHI, G. S.; G. MEDOFF, 1977. Antifungal agents: recent developments. *Ann. Rev. Microbiol*, v.31, p.291-308, 1977.

KOVACICOVA, G.; KRUPOVA, Y.; LOVASZOVA, M.; ROIDOVA, A; TRUPL, J.; LIKOVA, A; HANZEN, J.; MILOSOVIC, P.; LAMOSOVA, M.; MACEKOVA, L.; SZOVENYIOVA, Z., PRUGELOVA, A.; OBERTIK, T.; BILLE, J. KREMERY, V. *J. Infect. Chemother*, v.6, n4, p.216-221, 2000.

KULLAVANIJAYA, P.; ROJANAVANICH, V. Sucessful treatment of chomoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* by the combination of itraconazol anr cryotherapy. *In. J.Dermatol.*, Philadelphia, v.34, n.11, p.804-807, 1995.

KUMAR, B. KAUR, I.; CHAKRABARTI, A. SHARMA, V. K. Treatment of depp mycoses with itraconazol. *Mycopathologia*. The Hague, v.115, p.169-174, 1991.

JESSUP, C. J.; RYDER, N.S.; CHANNOUM, M. A A evalution of the in vitro activity of terbinafine. *Med. Mycol*, v. 38, n.2 ,p.155-159, 2000.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.Cromomicose. *In: Micologia Micologia médica, fungos, actinomicetos e algas de interesse médico* ., São Paulo: Savier., 8. ed, p.376-386, 1991.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. *Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico*. São Paulo: Savier, p.232-237, 1998.

LANE, C G. A cutaneous lesion caused by a new fungos *Phialophora verrucosa*. *J. Cutan. Dis*, v.33, p.840-848, 1915.

LARONE, D.H. THE identification of dematiaceous fungi. *Clin. Microbiol. Newsl.* Washington, v.11, n.19, p.145-152, 1989.

LARONE, D.H. *Medically important fungi- A guide identification*. Whashington: American Society for Microbiology, ASM Press, 3 ed., p.121-128, 1995.

LACASSIN, F.; DAMOMD, F.; CHOCHILLON, C. et al: Response to fluconazol by 23 patients with human immunodeficiency virus infection and oral candidiasis: pharmacological and mycological factors. *Antimicrob. Agents Chemother*, v.40, p.1961-1963, 1996.

.LAGUNA, F. RODRIGUEZ- TUDELA, J. MARTINEZ- SUÁREZ, J. Et al: Patterns of fluconazol susceptibility in isolates from human immunodeficiency virus- infected patients with oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans*. *Clin. Infect. Dis*, v.24, p.124-130, 1997.

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

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.; VERBRUCH, 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.

LESHER, J.L.Jr.; SMITH, J.G.Jr. Continuing medical education (Therapy). Antifungal agents in dermatology. *J.Am. Acad. Dermatol.*, Washington, v.17, n.3, p.383-394, 1997.

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

.LIEBOWITZ, L.D.; ASBEE, H.H.; EVANS. E.G.; CHONG, Y.; MALLATOVA, N.; ZAIDI, M.; GIBBS, D. A two year global evaluation of the susceptibility of

Candida species to fluconazole by disk diffusion. *Diagn. Microbio. Infect. Dis.*, v.40, n1-2, p27-33, 2001.

LOPES, C.F.; ALVARENGA; CISALPINO, E.O.; RESENDE, M. A Casos de cromomicose resistentes à 5-fluorocitosina. *Na. Brás. Dermatol*, Rio de Janeiro, v.53, p.1-9, 1978 a.

LOPES, C.F.; ALVARENGA, R.J.; CISALPINO, E.O.; RESENDE, M.A.; OLIVEIRA, L. G.Six years' experience in treatemt of chromomycosis with 5-fluorocytosine. *Int. J. Dermatol.*, Philadelphia.v.17, n.5,p.414-418, 1978b.

LOPES, C.F.; FRANCO, H.D.; RESENDE, M. A; OLIVEIRA, L.G.; ALVARENGA, ROBERTO, J.Butil- Simpatol no tratamento de um casos cromomicose. *An Bras. Dermatol.* Rio de Janeiro, v.48, p.265-268, 1973.

LOPES, C.F.; RESENDE, M. A.; ALVARENGA, R. J.; MOREIRA, Y.K. Associação de 5-fluorocitosina e amphotericina B no tratamento da cromomicose. *Méd. Cutan. Ibero Lat. Amer.*,v.7, n1/3, p.1-7, 1979.

LOUIE A; LIU, W.; MILLER, D. A et al. Efficacies of high-dose fluconazole plus 5-fluorocytosine versus amphotericin B, fluconazole and 5-fluorocytosine monotherapies in treatment of experimental endocarditis, endophthalmitis and pyelonephritis due to *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, v.43, p.2831-2840, 1999.

MARCHI, M.S. Cetoconazol e griseofulvina: quando esta, quando aquele? *Na. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v.66, n.4, p. 167-169, 1991.

MARQUES, S. A; DILLON, N. L.; STOLF, H. O, CAMARGO, R.M. P. Itraconazole plus flucytosine in the treatmant of chromoblastomycosis. *Aus. J. Dermatol*, n.38, suppl.2, p.106, 1947.

MAYANJA-KIZZA, H.; KAZUNORI, O.; MITARAI, S.; TAMASHITA, H.; NALONGO, K.; WATANABE, K.; IZUMI, T.; JUNGALA, O.; KADDHU, A.; MUGERWA, R.; NAGATAKE, T.; MATSUMOTO, K. Combination therapy with fluconazole and flucytosine for cryptococcal meningitis in Ugandan patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.*, v.26, p.1362-1366, 1998.

MCBURNEY, E.I.; Chomoblastomycosis treatment with ketoconazole. *Cutis*. New York, v.30, p.746-748, 1982.

MCGINNIS, M.R. Chomoblastomycosis and phaeophomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology, *J. Am. Acad. Dermatol*, St. Louis, v.8. p. 1-16, 1983.

MCGINNIS, M.R. *Laboratory Handbook of medical mycology*. New York: Academic Press, 1980, 661p

MCGINNIS, M.R.; PASSARELL, L. *In vitro* testing of susceptibilities of filamentous ascomycetes to voriconazole, itraconazole and amphotericin B, with consideration of phylogenetic implications. *J. Clin. Microbiol*, Chicago, v.36, p.2353-2355, 1998.

MCGINNIS, M. R.; PASSARELL, L. *In vitro* evaluation of terbinafine and itraconazole against dematiaceous fungi. *Med. Mycol.*, Plymouth, v.36, p.243-246, 1998.

MCGINNIS, M.R.; PASSARELL, L.; SUTTON, D.A.; FOTHERGILL, A.W.; COOPER JR.; C.R.; RINALDI, M.G.; *In vitro* activity of voriconazole against selected fungi. *Med. Mycol.*, Plymouth, v.36, p.239-242, 1998.

MCGINNIS, M.R.; RINALDI, M. G. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays activity in biologic fluids, *In Lorian V.*,

Antibiotics in laboratory medicine, 3. ed. Baltimore: The Williams Wilkins Co., 1991, p.198-257;

MCGINNIS, M.R.; SCHELL, W.A. The genus *Fonsecaea* and its relationship to the genera *Cladosporium*, *Phialophora*, *Ramichloridium*, and *Rhinocladiella*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE MYCOSES. *Superficial cutaneous subcutaneous infections*. Caracas, 1980. Pan Am. Heath Organ. Sci. Publ, 1980. n.396, p.215-234.

MEDLAR, E. M. Acutaneous infection caused by a new fungus *Phialophora verrucosa* with a study of the fungus. *J. Med. Res.*, v.32, p.507-522, 1915.

MEDOFF, F.; KOBAYASHI, G. A. The polyenes. In: SPELLER, D.; ed. *Ant. Chemotherapy*, New York: Wiley, 1980, p.3-33.

MEDOFF, G.; COMFORT, M.; KOBAYASHI, G.S.; Synergistic action of amphotericin B and 5-fluorocytosine against yeast-like organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*; New York, v.138, p...571-574, 1971.

MEDOFF, G.; KOBAYASHI, G.S.; KWAN, C.N.; SCHLESSINGER, D; VENKOV, P. Potentiation of rifampicin and 5-fluorocytosine as antifungal antibiotics by amphotericin B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v.69, p.196-199, 1972.

MENICHETTI, F.; FIORIO, M.TOSTI, A. et al. High-dose fluconazole therapy for cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis*, v.22, p.838-840, 1996.

MELETIADIS, J.; MOUTON, J.W.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; MEIS, J.F.G.M.; VERWEIJ, P.E. In vitro interaction of terbinafine with itraconazole against clinical isolates of *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob. Agents. Chemother*, p.470-472, 2000.

MEUNIER, F.; AQUN, M.; BITAR, N. Candemia in immuno compromised patients. *Clin, Infect, Dis.*, Chicago, v. 14, supl.1, p. S120-S125, 1992.

MEYER, R.D. Current role of therapy with amphotericin B. *Clin Infect. Dis.*, Chicago, v.14. spl.1, p. S154-S160, 1992.

MIKAMI, Y., TAKAHASHI, A.; YAZAWA, K.; TERAOKA, K.; UENO, Y. Synergic interaction of miconazole and fluconazole at sub- MIC level on *Candida albicans*. *Mycoses*, Berlin, v.35, p.11-12, 1992.

MINANI, P. S.; MENDES, M.J.S.; CUCÈ, L.C.; SALEBIAN, A. Crescimento de dermatófitos em meio contendo altas concentrações de griseofulvina. *An. Bras. Dermatol*, Rio de Janeiro, v.55, n.3. p. 121-124, 1980.

MITTAG, H.; KREYSEL, H. W. Klinik, Diagnostik und therapie der mykose. *Mycosen*, Berlin, v.25, n.8, p.413-423, 1982.

MIYAZAKI, H.; MIYAZAKI, Y.; GEBER, A.; PARKINSON, T.; HITCHCOCK.; FALCONER, D.; WARD, D.; MARSEDEN.K.; BENNETT, J. Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transport gene, *PDH1*, in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, p.1695-1701, 1998.

MONDON, P.; PETTER, R.; AMALFITANO, G.; LUZZATI, R.; CONCIA.; POLACHECK, I.; KWON-CHUNG, J. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, p.1856-1861, 1999.

MOORE, M.; ALMEIDA, F. Etiologic agents of chromomycosis (chromoblastomycosis of Terra, Torres, Fonseca and Leão, 1992) of North and South America. *Rev. Biol. Hyg*, v.6, 94-97, 1935.

MOORE, C. B.; WALLS, C.M.; DENNING, D. W. In vitro activity of the new triazole BMS-207147 against *Aspergillus* species in comparison with itraconazole and amphotericin B. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, p.441-443, 2000.

MONTGOMERIE, J. Z.; EDWARDS, J. E; GUZE, L. B Sinergism of amphotericin B and 5-fluorocytosine for *Candida species*. *J. Infect. Dis.*, v.132, p.82-86, 1975.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) Reference method for broth dilutions antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard. Villanova, NCCLS, 1992, v.12. M27-P.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) Reference method for broth dilutions antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. Villanova, NCCLS, 1997. v. 17. M27-A

NIELSEN, H.; STENDERUP, J.; BRUUN, B. Fungemia with saccharomycetacea. *Scand J. Infect. Dis.*, Stockholm, v.22, p. 581-587, 1990.

OAKLEY, K.L.; MOORE, C.B; DENNING, D. W. In vitro activity of SCH-56592 and comparison with activities of amphotericin B and itraconazole against *Aspergillus spp.* *Antimicrob. Agents. Chemother.*, p.1124-1126, 1997.

ODDS, F.C. *Candida and candidosis*, 2.ed.; London, Baillière Tindall, 1988, 468p.

ODDS, F.C. Interactions among amphotericin B, 5-fluorocytosine, ketoconazole, and miconazole against pathogenic fungi *in vitro* *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.22, p. 763-770, 1982.

ODDS, F. C.; ARAI, T.; DISALVO, A. F.; EVANS, E. G.V.; HAY, R. J.; RANDAHAWA, 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.

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.

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

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.

PETROU, M.A.; ROGERS, T.R. Interactions *in vitro* between polyenes and imidazole against yeasts. *J. Antimicrob. Chemother.*, London, v.27, p. 491-506, 1991.

PFALLER, M.A.; BALE, M.; BUSCHELMAN, B.; LANCASTER, M.; ESPINEL-INGROFF, A.; REX, J. H.; RINALDI, M.G.; 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.

PFALLER, M.A.; BUSCHELMAN, B.; BALE, M.J. et al. Multicenter comparison of a colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v.19, p.9-13, 1994.

PFALLER, M. A; MESSER, S. A.; MILLS, K; BOLMSTROM, A. *In vitro* susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of methods and reference

microdilution methods for determining itraconazole MICs. *J. Clin. Microbiol.*, p.3359-3361, 2000.

PIVETA, M. Dá malaria às doenças emergentes. *Ciência Medicina. Pesquisa Fapesp*, n73, p.31-39, 2000.

PRESTERL, E.; GRANINGER, W. New aspects in treatment of systemic mycoses. *Wien Klin Wochenschr*, v.21, p. 740-750, 1998.

POLAK, A. Determination de la synergie entre la 5-fluorocytosine et tris différents dérivés de l'imidazole au moyen de diferentes modèles *in vitro et in vivo*. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Med.*, Paris, v.9. p.263-268, 1980.

POIRRIEZ, J. BREUILLARD, F. FRANCOIS, N.; FRUIT, J.; SENDID, B. GROSS, S.; DEI-CAS, E. A case chormomycosis treated by a combination of crytherapy, shing, oral 5-fluorocytosine, and oral amphotericina B. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.63, p'.61-63, 2000.

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.

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

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

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

RESENDE, M. A; CALIGIORNE, R.B.; MELILLO, P. H. C.; PELLUSO, C. P. *In vitro* suscetibility of chomomycosis and phaeohyphomycosis to antifungal drugs. In: 13° CONG. INT. SOC. HUM. MYCOL.-ISHAM. Parma, 1997. Abstr. p.196.

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 (vascular). *Ver. Soc. Bras. Med.Trop.Brasília*, v.9, n.2, p.73-77, 1973

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

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

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 Standardas- recommende brot macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. *J. Clin. Microbiol.* Whashington, v.34, p.816-817, 1996.

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

REX, J. PFALLER, M.; GALGIANI, J et al: Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in

vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin Infect. Dis*, v.24, p. 235-247, 1997.

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

RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D. W. Fungal infection: diagnosis and management. Oxford: Blackwell., 1993.p.17-42.

RIPPON, J.W. The subcutaneous mycoses- Chomoblastomycosis. In: Rippon, J. W. *Medical Mycology . The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1982, p.276-296.

RIPPON, J. W. *Medical Mycology*. W. B. Saunders. Philadelphia, 1974, p.531-544.

RODRIGUEZ- TUDELA, J. MARTINEZ-SUÁREZ, J. DRONDA, F. Et al. Correlation of *in –vitro* susceptibility test results with clinical response: astudy of azole therapy in AIDS patients. *J. Antimicrob. Chermother*, v.35, p. 793-804, 1995.

ROBISON, R.C.V.; FERCIOT, T. N.; ROBISON, H.M. Jr. *In vitro* resistance studies with griseofulvina. *A. M. A. Arch. Dermatol*, New York, v.81, p.681-683, 1960.

.ROGERS, T.R. Optimal use of existing and new antifugal drugs. *Curr. Opin. Crit. Care*, v.7,n.4, p.238-341, 2001.

RUDOLPH, M.Über die Brasilianische "Figuera" (Vorläufige Mitteilung). *Arch. Schiffs-Tropenhyg.*, v.18, p.498-499, 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.

RUNKE M.; EIGLER. A.; TENNAGEN, I. et al: Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol*, v.32. p. 2092-2098, 1994.

RUHNKE, M., SCHIMIDT-WESTHAUSEN, A.; ENGELMANN, E. et al: Comparative evaluation of three antifungal susceptibility test methods for *Candida albicans* isolates and correlation with response to fluconazole therapy. *J. Clin Microbiol*, v.34, p.3208-3211, 1996.

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

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

RYDER, N. S.; WAGNER, S.; LEITNER, In vitro activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, p.1057-1061, 1998.

RYDER, N. S. Activity of terbinafine against serious fungal pathogens. *Mycoses*, v. 42, suppl. 2, p. 115-119, 1999.

SAAG, M.S.; DIMUKES, W. Azole antifungal agents: emphasis on new triazole. *Antimicrob. Agents. Chemother.* Washington, v.32, p.1-8, 1988.

SANATI, H.; RAMOS, C. F.; BAYER, A S.; GHANNOUM, M.A. Combination therapy with amphotericin B and fluconazole against invasive candidiasis in neutropenic-mouse and infective-endocarditis rabbit models. *Antimicrobiol. Agents. Chemother*, v.41, p.1345-1348, 1997.

SÁNCHEZ, C.; MAURI, E.; DALMAU, D. et al: Treatment of cerebral aspergillosis with itraconazole: do high doses improve the prognosis ? *Clin. Infect. Dis.*, v.21. p.1485-1487, 1995.

SANGEORZAN, J. BRADLEY, S.; HE, X. et al: Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am. J. Med.* v.97, p.339-353, 1994.

SANGLARD, D.; KUCHLER, K; ISCHER, F. et al: Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob. Agents. Chemother.*; v.39, p.2378-2386, 1995.

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

SHAFFNER, A.; FRICK. P.; The effect of ketoconazon amphotericim B in a model of disseminated aspergillosis. *J.Infect. Dis*, v.151, p.902-910, 1985.

SHADOMY, S.; PFALLER, M. A. Laboratory Studies with antifungal agents: 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*, 5. ed. Whashington; American Society for Microbiology, ASM Press, 1991, p.1173-1181.

SCHELL, W. A; PASARELL, L.; SALKIN, I. F.; MCGIINIS, M. R. *Bipolares, Exophiala, Scedosporium, Sporothix*, 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, 7. ed. Washington: American Society of Microbiology, AMS Press, 1999, p.1295-1313.

SCHEVEN, M.; SCHWEGLER, F. Antagonistic interactions between azoles and amphotericin B with yeast depend on azole lipophilia for special test conditions *in vitro*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, v.39, p.1779-1783, 1995.

SCHOLER, H. J.; POLAK, A. Resistance to systemic antifungal agents. In: Bryan, L.E; ed. *Antimicrob. Drug Resistance*, Orlando, Academic Press, 1984.

STEVENS, D.A.; KULLBERG, B.J.; BRUMMER, E.; CASADEVALL, A.; NETEA, M.G.; SUGAR, A.M. Combined treatment: antifungal drugs with antibodies cytokines or drugs. *Medical Mycology*, v.38, supp.1, p.305-315, 2000.

SINGH, N.; BARNISH, M. BERMAN, S. et al: Low-dose fluconazole as primary prophylaxis for cryptococcal infection in AIDS patients with CD4 cel counts of ≤ 100 mm: demonstration of efficacy in a prospective, multicenter trail. *Clin. Infect. Dis.*, v.23, p. 1282-1286, 1996.

SILVA, A. C. M.; NETO, A S.; GALVÃO, C. E.; MARQUES, S.; SALDANHA, A. C; SIVA, 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. *Ver. Socied. Bras. Méd. Trop.*, Brasiliis, v.25, n.1, p.37-44, 1992.

SILVA, J.P.; SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Chomobastomiycosis: A retrospective study of 325 cases on Amazonic region (Brasil). *Mycopathologia*. The Hague, v. 143, p.171-175, 1999.

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 Farmacêutica- Universidade de São Paulo).

SOARES, M.M.S.R.; CURY, A.E. Atividade de alguns antifúngicos contra fungos isolados de diferentes classes de pacientes. RBAC, Rio de Janeiro, v.7, p.3-11, 1995.

SOARES, M.M.S.R.; CURY, A.E.; SCHREIBER, A.Z. Micoses superficial da região podal em indivíduos considerados imunocomprometidos. *An. Brás. Dermatol.*; Rio de Janeiro, v.20, p.211-217, 1995.

SOBEL, J. VASQUEZ. J. Symptomatic vulvovaginitis to fluconazole- resistant *Candida albicans* in female who was not infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis* v.22, p. 726-725, 1996.

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.

SOKOL-ANDERSON, M.L; SLIGH, J. E; ELBERG, S; BRAJTBURG, J.; KOBAYASHI, G. S.; MEDOFF, G. Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. *Antimicro. Agents. Chemother.*, Washington, v.32, n.5. p.702-705, 1988.

SUGAR, A M.; HITCKCOOK, C.A; TROKE, P. f.; PICARD. M. Combination therapy of murine invasive candidiasis with fluconazole and amphotericin B. *Antimicrob. Agents. Chemother*, v.39, p.598-601, 1995.

SUGAR, A.M. Use of amphotericin B with azole antifungal drugs: what are we doing?. *Antimicrob. Agents. Chemother*, v.39, p.598-601, 1995.

SUGAR A.M.; LIU, X.P. Interactions of itraconazole with amphotericin B in the treatment of murine invasive candidiasis. *J.Infect. Dis.*, v.177, p.1660-1663, 1998.

SUGAR, A.M.; Antifungal combination therapy: where we stand. *Drugs Resistance Uptape*, v.1, p.89-92, 1998.

SZEKELY, A.; JOHNSON, E.M.; WARNOCK, D. Comparison of E-etes and broth microdilution methods fo antifungal drug susceptibility testing of molds. *J. Clin. Microbiol.*, p.1480-1483, 1999.

TERRA, F. TORRES, M. FONSECA FILHO, O. ARÊA Leão, A .E. Novo topo dermatite verrucosa; micose por *Acrotheca* com associação de leishmaniose. *Brasil Médico*, v. 36, p. 3630368, 1992. Apud: Al- DOORY, Y. Chomomycosis. Mi ssoula: Mountain Press, 1972, 203p.

TUFFANELLI, L. MILBURN, P. B. Treatment of chromoblastomucosis. *J. Am. Acad. Dermatol*, v.23, p.728-732, 1990.

UITTO, J. SANTA-CRUZ, D. J.; EISEN, A Z, KOBAYASHI, G. S. Chromomycosis. successful treatment with 5-fluorocytosine. *J. Cutan. Pathol*, v.6, p. 77-84, 1979.

VANDEN BOSSCHE, H. Mechanisms of antifungal resistance. *Revista Iberoamericana de micologia.*, Bilbao, v.14, p.44-9, 1997.

VADEN BOSSCHE, H. DROMER, F.; IMPROVISI, I.; LOZANO- CHIU.; REX, J. H. SANGLARD, D. Antifungal drug seristence in pathogenic fungi. In. Proceedings of the XIV Congress Int. Soc. Hum. Mycol. _ISHA, PARMA 1997., *Medical Mycology*. V. 36, supl. 1, p. 119-128, 1998.

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.

VAN DER AUWERA, P. Synergistic, additive, and antagonistic activity of antimicrobial agents: how to measure? What are the clinical consequences? Application to the new fluoroquinolones. *Infect. Dis. Newslet.*, New York, v.11, p.45-56, 1992.

VIVAS, J.R.; TORRES-RODRIGUEZ, J.M. In vitro antifungal susceptibility of dematiaceous filamentous fungi using the E-test. *Rev. Esp. Quimioter.*, v.14, p.191-197, 2001.

WALMSLEY, S.; KING, S.; MCGEER, A; YE, Y; RICHARDSON, S. Oropharyngeal candidiasis in patients with human immunodeficiency virus: correlation of clinical outcome with in vitro resistance, serum azole levels, and immunosuppression. *Clin. Infect. Dis.*, v.32, n.11, p.1554-61, 2001.

WHEELER, M. H; BELL, A. A. Melanin and their importance in pathogenic fungi. In; MCGINNIS, M. R. ed. *Current topics in medical mycology*, v.2. New York: Spindler- Verlag, 1987, p.338-387.

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

WILDFEUER, A ; SEIDL, H.P.; PAULE, I; HABERREITER.A. In vitro evaluation of voriconazole against clinical isolates of yeasts, moulds and dermatophytes in comparison with itraconazole, ketoconazole, amphotericin B and griseofulvin. *Mycoses*, v.41, p.309-319, 1998.

YOSHIDA, T.; JONO, K.; ONOGI, K. Modified Agar dilution susceptibility testing method fo determinig *in vitro* activities of antifungal agents, including azole compounds. *Antimicrob. Agents. Chemother*, Washington, v.41, p. 1349-1351, 1997.

YU, R. Sucessful trestment of chomoblastomycoisi with itraconazole. *Mycoses* Berlin, v.38, p. 79-83, 1995.

YU, R. Y.; GAO, L. Chomoblastomycosis successfully treated with fluconazole. *Int. J. Dermatol*, v. 33, p. 716-719, 1994.

YU, R. J.; BLANK. On the mechanism of actino of griseofulvin in dermatophytosis. *Sabouraud*, v.11, p.274-278, 1973.

ZAITS, C. Os caminhos da investigação de novos antifúngicos. *Na. Bras. Dermatol.* Rio de Janeiro, v.67, n.4, p. 184-186, 1992.

ZEPPENFELDT, G. RICHARD-YEGRES, YEGRES, F.; HERNÁNDEZ. R. *Cladosporium carrionii*: hongo dimófico en caractáceas de la zona endémica para la cromomycosis en venezuela. *Rev.Iberoam. Micol.*, v. 11, p.61-63, 1994.