



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**NANOEMULSÕES DE ANFOTERICINA B E ITRACONAZOL: AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* EM AGENTES DA
CROMOBLASTOMICOSE**

TATIANE CAROLINE DABOIT

Porto Alegre, fevereiro de 2013.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**NANOEMULSÕES DE ANFOTERICINA B E ITRACONAZOL: AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* EM AGENTES DA
CROMOBLASTOMICOSE**

TATIANE CAROLINE DABOIT

Orientador: Maria Lúcia Scroferneker
Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, fevereiro de 2013.

CIP - Catalogação na Publicação

DABOIT, Tatiane Caroline

NANOEMULSÕES DE ANFOTERICINA B E ITRACONAZOL:
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO E IN VIVO
EM AGENTES DA CROMOBLASTOMICOSE / Tatiane Caroline
DABOIT. -- 2013.
224 f.

Orientadora: Maria Lúcia Scroferneker.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Nanoemulsões. 2. Antifúngicos. 3.
Cromoblastomicose. 4. Suscetibilidade In Vitro. 5.
Atividade Antifúngica In Vivo. I. Scroferneker,
Maria Lúcia, orient. II. Título.

Dedico este trabalho ao amor da minha vida,
Tiago e aos meus Pais, Angelino e Ana,
pelo amor, compreensão e apoio em todos os instantes.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^a Dr^a. Maria Lúcia Scroferneker, primeiramente pelas oportunidades concedidas desde a iniciação científica e confiança em mim depositada. Obrigada também pela orientação dedicada, pelos conhecimentos compartilhados, incentivo, amizade e pelos ensinamentos para a vida.

À Prof^a Dr^a. Silvia Guterres e Prof^o. Dr. João Antônio Pegas Henriques, por todo auxílio e disponibilidade, indispensáveis para a realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a. Maria Isabel Edelweiss pela amizade, disponibilidade, paciência e principalmente, por todas as leituras de lâminas histológicas, que não foram poucas.

À Prof^a. Dr^a. Patrícia Valente, pela disponibilidade, amizade, apoio, valiosos auxílios e pela atenção dedicada ao longo deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Micologia do Serviço de Dermatologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre pela acolhida e especialmente ao Dr. Gerson Vettorato pela oportunidade de publicarmos em conjunto os casos clínicos.

Aos colegas do laboratório 210 do ICBS pelos cafés compartilhados, pela amizade e pela agradável convivência.

Às colegas de Pós-Graduação Cibele Magagnin, Daiane Heidrich e Cheila Stopiglia, pela amizade, companheirismo, apoio, troca de experiências e conhecimentos e pelo incentivo e colaboração durante a realização deste trabalho.

Às bolsistas de iniciação científica Laura Antochewis, Suelen Vigolo, Lúcia Meirelles e Karine Alves, que foram indispensáveis para realização dos experimentos em todas as fases deste trabalho.

A toda equipe do laboratório Genotox-Royal, em especial à Miriana Machado e Miriam Benício, pela amizade, troca de conhecimentos e pelo apoio que foi fundamental na realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório 405 da Faculdade de Farmácia Letícia Colomé, Kelly Bueno, Thatiana Terroso, Cassia Detoni, Lucas Rigo, Gabriele Dadalt, Júlia Santos e Guilherme Soares por todo auxílio durante a realização deste trabalho.

Aos colegas Maurício Castrillón e Sandra Mendes pelo auxílio nos experimentos de Biologia Molecular.

A toda equipe da Unidade de Experimentação Animal do HCPA, em especial à Marta Cioato e Fabíola Meyer pelo auxílio nos experimentos com animais de laboratório.

À Daniela Fagundes, minha querida cunhada, pelo auxílio na revisão da tese.

À CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos e ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste projeto de pesquisa (Processo CNPq nº 482635/2010-0).

À UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas pela oportunidade de aprendizado.

Às minhas queridas amigas Leila Ruschel e Roberta Stefanello, pela amizade, força, apoio, descontração, conselhos, choros, risadas e desabafos durante todas as fases deste trabalho.

Um agradecimento especial aos meus pais Angelino e Maria Ana, que me criaram, educaram, apoiaram minhas escolhas e hoje se orgulham das minhas conquistas. Obrigada por todo amor, incentivo e oportunidades que me concederam.

Aos meus irmãos Samuel e Bárbara e minha cunhada Jenifer pela amizade, compreensão, paciência, pelos ótimos momentos juntos e pela torcida.

Ao meu amado marido Tiago, por estar comigo mesmo longe, desde o início desta longa caminhada. Por todo amor, carinho, cumplicidade, amizade, incentivo constante, apoio incondicional e principalmente pela paciência nos momentos de ausência e naqueles em que passei sem lhe dar a merecida atenção.

Aos meus filhinhos peludos, que me amam incondicionalmente e esperam por mim todos os finais de semana... Obrigada por tornarem minha vida mais feliz!

A toda Família Fagundes pela compreensão da minha ausência em muitos momentos, pelo apoio e pela vibração com as minhas conquistas.

A todos que, de uma forma ou de outra, me auxiliaram de forma direta ou indireta.

A Deus por ter iluminado meus caminhos e me dado força nos momentos em que achei que não iria conseguir. Obrigada pelas coisas boas que me cercam.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

Resumo

Cromoblastomicose é uma micose crônica que acomete a pele e o tecido subcutâneo. Vários tratamentos têm sido utilizados, mas a eficácia é extremamente baixa, não permitindo eleger uma terapia de escolha. No presente trabalho foram realizados: I – ensaios de suscetibilidade *in vitro* de agentes da cromoblastomicose contra antifúngicos comerciais; II - caracterização molecular de amostras oriundas de casos clínicos, bem como a descrição destes casos; III - a produção e caracterização de duas nanoemulsões, uma de anfotericina B e uma de itraconazol produzidas pela técnica de homogeneização à alta pressão; IV - a avaliação da atividade antifúngica destas nanoemulsões *in vitro* e *in vivo* em agentes da cromoblastomicose; V - a verificação do nível de comprometimento renal e hepático causados pelas nanoemulsões; VI - a avaliação da toxicidade das formulações produzidas. De modo geral, os agentes da cromoblastomicose, apresentaram maior suscetibilidade à terbinafina e ao itraconazol, respectivamente. A combinação de anfotericina B e terbinafina foi sinérgica para quatro dos cinco grupos avaliados. Quanto aos casos clínicos, no primeiro foi identificada uma infecção por *E. spinifera* e no segundo uma por *Fonsecaea monophora*. As nanoemulsões foram elaboradas com composição passível de administração parenteral, uma de anfotericina B e uma de itraconazol, pelo método de homogeneização à alta pressão. Não foi possível determinar as CIMs da nanoemulsão de anfotericina B e Abelcet[®] *in vitro*, enquanto que a nanoemulsão de itraconazol apresentou CIMs muito semelhantes às do fármaco livre. Em modelo animal de cromoblastomicose, a nanoemulsão de anfotericina B foi mais ativa que o fármaco livre, Fungizone[®] e Abelcet[®]. A nanoemulsão de itraconazol também apresentou melhor atividade quando comparada com o fármaco livre. Os níveis de uréia foram mais elevados nos animais

que receberam anfotericina B livre e Fungizone[®]. A enzima alanina aminotransferase foi encontrada em níveis menores nos animais tratados com a nanoemulsão de itraconazol do que naqueles que receberam itraconazol livre. A anfotericina B livre e Fungizone[®] causaram graves danos aos rins. Nos animais tratados com Abelcet[®] e com a nanoemulsão de anfotericina B foi possível verificar apenas necrose focal. Da mesma forma, a nanoemulsão de itraconazol protegeu os animais contra danos hepáticos quando comparada com o fármaco livre. Em relação aos ensaios de toxicidade, a anfotericina B foi citotóxica em concentrações a partir de 4µg/mL, sendo que com a nanoemulsão esta toxicidade não foi observada em concentrações mais elevadas. O itraconazol foi citotóxico, sendo que este efeito não foi visto com a nanoemulsão. É de extrema importância a avaliação da suscetibilidade dos agentes da cromoblastomicose a fim de orientar a clínica. A identificação molecular de agentes isolados de casos clínicos pode contribuir para delinear o perfil epidemiológico da doença. As nanoemulsões de anfotericina B e itraconazol apresentaram atividades superiores *in vivo* quando comparadas aos demais tratamentos e foram capazes de reduzir os efeitos adversos causados por estes antifúngicos. Através de ensaios *in vitro* foi confirmada a redução da citotoxicidade do fármaco quando veiculado na nanoemulsão. Assim, as nanoemulsões produzidas poderiam ser alternativas terapêuticas para o tratamento da cromoblastomicose.

PALAVRAS-CHAVE: Cromoblastomicose, *F. monophora*, *Exophiala spinifera*, suscetibilidade *in vitro*, antifúngicos, marcadores moleculares, atividade antifúngica *in vivo*, nanoemulsão, anfotericina B, itraconazol, nanotoxicologia.

Abstract

Chromoblastomycosis is a chronic mycosis that affects the skin and subcutaneous tissue. Various treatments have been used, but the efficacy is extremely low and does not allow choosing a therapy of choice. In the present work was performed: I - *in vitro* susceptibility testing for chromoblastomycosis agents against commercial antifungal; II - molecular characterization of samples from clinical cases as well as the description of these cases III - production and characterization of two nanoemulsions , one of amphotericin B and one of itraconazole, produced by high pressure homogenization technique; IV - assessing the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of these nanoemulsions against chromoblastomycosis agents; V - checking the level of impairment caused in the kidney and liver by nanoemulsions; VI - evaluation of toxicity of the formulations produced.

In general, the chromoblastomycosis agents showed greater susceptibility to terbinafine and to itraconazole, respectively. The combination of amphotericin B and terbinafine was synergistic to four of the five groups. As for clinical cases, in the first was identified an infection by *E. spinifera* and in the second one by *Fonsecaea monophora*. The nanoemulsions were prepared with composition amenable of parenteral administration, one of amphotericin B and one of itraconazole, by the at high pressure homogenization method. Could not be determined the MIC of amphotericin B nanoemulsion and Abelcet[®] *in vitro*, while the itraconazole nanoemulsion showed MICs very similar to free drug. In a chromoblastomycosis animal model, the amphotericin B nanoemulsion was more active than free drug, Abelcet[®] and Fungizone[®]. The nanoemulsion of itraconazole also showed better activity compared to the free drug. Urea levels were higher in the animals receiving amphotericin B free and Fungizone[®]. The enzyme alanine aminotransferase was

found in lower levels in animals treated with itraconazole nanoemulsion than in those who received itraconazole free. Amphotericin B free and Fungizone[®] caused severe damage to the kidneys. Already in animals treated with Abelcet[®] and the amphotericin B nanoemulsion was verified only focal necrosis. Likewise, the itraconazole nanoemulsion protected against liver damage when compared with the free drug. Regarding toxicity assays, amphotericin B was cytotoxic at concentrations from 4 µg/mL, while with the nanoemulsion this toxicity was not observed at higher concentrations. Itraconazole was cytotoxic, and this effect was not observed with the nanoemulsion. It is extremely important to evaluate the susceptibility of chromoblastomycosis agents to guide the clinic. Molecular identification of agents isolated from clinical cases can contribute to outline an epidemiological profile of the disease. The amphotericin B and itraconazole nanoemulsions showed higher activities *in vivo* when compared to other treatments and were able to reduce the adverse effects caused by these antifungals. Through *in vitro* assays were confirmed the reduction of the cytotoxicity of the drug when vehiculated in the nanoemulsion. Therefore, the nanoemulsions may be produced therapeutic alternatives for the chromoblastomycosis treatment.

KEYWORDS: Chromoblastomycosis, *F. monophora*, *Exophiala spinifera*, *in vitro* susceptibility, antifungals, molecular markers, *in vivo* antifungal activity, nanoemulsion, amphotericin B, itraconazole, nanotoxicology.

Lista de Figuras da Revisão

- Figura 1.** Principais tipos de lesões observadas na cromoblastomicose: A) nodular, B) verrucosa, C) tumoral e D) placa.....32
- Figura 2.** A) Visualização de células escleróticas por exame micológico direto (x 40); B) Cultura de agente da cromoblastomicose com crescimento de 30 dias em Agar Sabouraud. C) Corte histológico com célula de Langerhans contendo várias células muriformes (coloração H&E, x 100).....34
- Figura 3.** A) Corpo de frutificação predominante de *Fonsecaea* spp. (azul de lactofenol, x 40) B) Corpos de frutificação de *C. carrionii* (azul de lactofenol, x 100) ; C) Estrutura de reprodução assexuada de *P. verrucosa* (x 100); D) Estrutura de reprodução assexuada de *R. aquaspersa* (azul de lactofenol, x 40); E) Corpo de frutificação de *E. spinifera* (x 40).....35
- Figura 4.** Mecanismo de ação e estrutura molecular da anfotericina B: A) Molécula; B) Local de ação do antifúngico.....47
- Figura 5.** Mecanismo de ação e estrutura molecular do itraconazol: A) Local de atuação dos azólicos; B) Molécula do itraconazol.....49

Lista de Abreviaturas da Revisão

SIGLA	Significado
ITS	Internal Transcribed Spacer
DNA	Deoxyribonucleic Acid
H&E	Hematoxilina e Eosina
RCA	Rolling Circle Amplification
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CIM	Concentração Inibitória Mínima
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	Food and Drug Administration
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

Sumário

1 Introdução	17
2 Revisão da literatura.....	23
2.1 Cromoblastomicose.....	24
2.1.1 Aspectos gerais.....	24
2.1.2 Epidemiologia.....	25
2.1.3 Etiologia.....	26
2.1.4 Habitat.....	28
2.1.5 Patogenia.....	29
2.1.6 Características clínicas.....	31
2.1.7 Diagnóstico.....	33
2.1.8 Tratamento.....	37
2.1.9 Ensaios de suscetibilidade aos antifúngicos.....	39
2.1.10 Modelos animais de cromoblastomicose.....	40
2.2 Feohifomicose.....	44
2.3 Fármacos antifúngicos.....	45
2.3.1 Anfotericina B.....	45
2.3.2 Itraconazol.....	47
2.4 Nanotecnologia - Nanomedicina.....	50
2.4.1 Nanoemulsões.....	52
2.4.2 Formulações nanoestruturadas comerciais de anfotericina.....	54
2.4.3 Nanoemulsões de anfotericina B.....	56
2.4.4 Utilização de formulações nanoestruturadas de anfotericina B no tratamento da cromoblastomicose.....	59

2.4.5	Formulações nanoestruturadas comerciais de itraconazol.....	60
2.4.6	Nanoemulsões de itraconazol.....	61
2.4.7	Utilização de formulação nanoestruturada de itraconazol no tratamento da cromoblastomicose.....	61
2.4.8	Propriedades biológicas das principais matérias-primas a serem utilizadas nas nanoemulsões desenvolvidas.....	62
2.4.9	Toxicologia de sistemas nanoestruturados.....	62
3.	Objetivos.....	67
3.1	Objetivo principal.....	68
3.2	Objetivos secundários	68
4	Referências da Revisão.....	70
5	Artigos	96
Capítulo I	- Nanoemulsão de anfotericina B: avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em agentes da cromoblastomicose.....	97
Capítulo II	- Suscetibilidade <i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> de agentes da cromoblastomicoses à nanoemulsão de itraconazol.....	135
Capítulo III	- A case of <i>Exophiala spinifera</i> infection in Southern Brazil: molecular identification and antifungal susceptibility.....	164
Capítulo IV	- A case of relapsed chromoblastomycosis due to <i>Fonsecaea monophora</i> : antifungal susceptibility and phylogenetic analysis.....	178
Capítulo V	- <i>In vitro</i> susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and the combination of terbinafine and amphotericin B	194

6 Considerações Finais.....	215
7 Anexos.....	219

1. Introdução

A cromoblastomicose é uma infecção crônica, granulomatosa da pele e tecido subcutâneo, decorrente da implantação traumática transcutânea de propágulos de diversas espécies de fungos filamentosos pertencentes à família *Herpotrichiellaceae*.^[1-3]

Os principais agentes etiológicos desta patologia são *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii*. Também são causadores desta micose os fungos *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquaspersa*, *Exophiala spinifera*.^[4-6] Estes fungos encontram-se em saprofitismo na natureza, ocorrendo na vegetação e no solo.^[7]

A cromoblastomicose é uma patologia essencialmente de adultos. A maior parte dos casos é diagnosticada em indivíduos com 30 anos de idade ou mais, o que explica parcialmente a cronicidade desta doença. Afeta, principalmente, trabalhadores de zonas rurais, tendo predominância em homens. As lesões concentram-se principalmente nos membros inferiores. A morbidade nesta doença surge de infecções bacterianas secundárias, da inabilidade da parte do corpo afetada ou da transformação das células escamosas em carcinoma.^[2,8]

Clinicamente, a doença é caracterizada pelo desenvolvimento de verrucose, placas escamosas, bem como de manchas atróficas e de lesões ulcerativas. Também estão presentes estruturas arredondadas de coloração marrom, conhecidas como células muriformes, que podem ser visualizadas através do exame micológico direto ou cortes histológicos.^[2,9]

Os pacientes com cromoblastomicose são um desafio terapêutico. Dos medicamentos e procedimentos descritos na literatura para o tratamento desta

doença, nenhum podem ser considerado de escolha, devido ao baixo índice de eficácia em longo prazo.^[3,5] A cura espontânea da doença é rara. O tratamento é longo e sujeito a recidiva na maior parte dos casos. As opções de terapia antifúngica incluem anfotericina B, itraconazol, tiabendazol, 5-fluorotosina, terbinafina, fluconazol e cetoconazol. Todos estes fármacos estão associados a efeitos adversos e requerem acompanhamento das funções renal e hepática.^[3,10]

Os ensaios de atividade antifúngica *in vitro* têm avançado consideravelmente nos últimos anos, levando-se em conta que a primeira metodologia padronizada para teste com fungos filamentosos foi disponibilizada apenas em 2002. Devido ao recente desenvolvimento de testes de suscetibilidade antifúngica, a disponibilidade de dados *in vitro* de fungos dematiáceos é relativamente escassa e, na maior parte das vezes, apresenta um número pequeno de isolados por espécie.^[11] Estes ensaios são importantes para o conhecimento do perfil de suscetibilidade dos isolados, bem como identificar agentes etiológicos resistentes e prever a resposta clínica.^[12-14]

A identificação molecular dos isolados de agentes da cromoblastomicose é importante para fins epidemiológicos. No gênero *Fonsecaea*, houve uma recente revisão taxonômica, sendo que atualmente são reconhecidas cinco espécies: *Fonsecaea pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica*, *F. multimorphosa* e *F. brasiliensis*. Estas espécies são morfológicamente similares, mas os aspectos clínicos das infecções causadas pelas mesmas diferem ligeiramente.^[15-19] Na identificação molecular dos agentes da cromoblastomicose de modo geral, uma das técnicas amplamente utilizadas está o sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal.^[20, 21]

Há poucos modelos animais utilizando fungos dematiáceos. Estes estudos são importantes para a avaliação de fármacos ou formulações novas, a fim de se ter

conhecimento do comportamento destes tratamentos quando aplicados em um organismo complexo, variáveis que, muitas vezes, não podem ser reproduzidas com rigor em modelos *in vitro*.^[22]

Exophiala spinifera é um fungo dematiáceo associado tanto à cromoblastomicose como à feohifomicose, mas de rara ocorrência, com menos de 30 casos relatados em todo o mundo.^[6,14]

A nanotecnologia é uma área da ciência dedicada à concepção, construção e utilização de estruturas funcionais na escala nanométrica. O campo da nanotecnologia aplicada na terapêutica, denominada por muitos autores como nanomedicina, está crescendo rapidamente e a aplicação da nanotecnologia nesta área levou a avanços em sistemas de entrega de fármacos, biomateriais e dispositivos biomédicos.^[23]

Nanoemulsões são dispersões termodinamicamente estáveis, formadas por duas fases líquidas, nas quais uma geralmente consiste de uma solução aquosa contendo uma mistura de tensoativos e eletrólitos e a outra, uma fase orgânica. Macroscopicamente a nanoemulsão se apresenta com aspecto homogêneo e isotrópico e, microscopicamente constante de milhares de gotículas estabilizadas pela adsorção de surfactantes na interface entre os dois líquidos. Em função da natureza do sistema, as gotículas têm distribuição de tamanho entre 50-200 nm, podendo ter até 500 nm.^[24 -27]

A homogeneização à alta pressão é uma técnica amplamente empregada no preparo de nanoemulsões, que permite a obtenção de sistemas monodispersos, de diâmetro reduzido e em larga escala.^[28]

O primeiro fármaco comercializado em nanossistemas foi a anfotericina B. A formulação (Ambisome[®]) utiliza como nanocarreador os lipossomas. Outras duas formulações nanoestruturadas são comercializadas: Abelcet[®] e Amphocil[®] (Amphotec[®]). Para todas estas formulações é relatada a manutenção ou o aumento da atividade do fármaco e redução drástica dos efeitos adversos, quando comparadas com a formulação convencional (Fungizone[®]).^[29-32] A anfotericina B, pelo fato de ser um fármaco antifúngico de grande eficácia na clínica, mas com efeitos adversos associados gravíssimos, em especial a nefrotoxicidade foi o foco de muitos estudos que produziram formulações nanoestruturadas de anfotericina B.^[33,34] Quanto à utilização das formulações comerciais em infecções por agentes da cromoblastomicose, apenas dois relatos foram encontrados com resultados contrastantes.^[35,36]

O itraconazol é um fármaco antifúngico amplamente empregado na clínica, assim como a anfotericina B. Possui grande atividade contra agentes da cromoblastomicose.^[37,38] Em alguns países é comercializado em nanossistemas, principalmente devido ao fato de apresentar biodisponibilidade errática quando administrado na forma convencional pela via oral e ter como efeito adverso a hepatotoxicidade. Entretanto, o nanocarreador empregado apresenta toxicidade associada, o que impulsiona estudos neste sentido.^[39-41] Não há relato na literatura de utilização das nanoformulações comerciais de itraconazol em casos de cromoblastomicose.

A nanotoxicologia, outra vertente da nanotecnologia, tem por função abordar especificamente os efeitos adversos para a saúde que possam ser causados por nanomateriais, a fim de resolver as lacunas do conhecimento nesta área.^[42] A nanotoxicologia engloba determinantes físico-químicas, vias de exposição,

biodistribuição, determinantes moleculares, genotoxicidade e aspectos regulatórios. Além disso, a nanotoxicologia está envolvida em propor protocolos de testes confiáveis e robustos para os nanomateriais, na avaliação de risco ambiental e humano. ^[42,43] Dentre os testes amplamente utilizados nesta avaliação estão o teste clonogênico, teste de mutação reversa bacteriana e ensaio cometa. ^[44-46] Apesar da utilização de materiais biocompatíveis na produção de nanocarreadores de fármacos, é imprescindível avaliar sua toxicidade. ^[47] Além disso, a anfotericina B e o itraconazol possuem toxicidade intrínseca ^[37] e, é imprescindível avaliar se esta toxicidade é reduzida quando estes fármacos estão incorporados em um nanosistema.

2.1 Cromoblastomicose

2.1.1 Aspectos Gerais

A Cromoblastomicose foi observada pela primeira vez no Brasil em 1911 por Moraes Pedroso, mas somente em 1920 os casos foram publicados por Pedroso e Gomes.^[48] Em 1914, Max Rudolph publicou os primeiros casos de cromoblastomicose, que a descreveu como uma doença exótica chamada "figueira" que acometia trabalhadores rurais do interior do Estado de Minas Gerais.^[49,50] O termo "cromoblastomicose" foi introduzido por Terra et al. em 1922,^[51] sendo considerado adequado por McGinnis^[5] no intuito de diferenciar a doença das demais causadas por fungos negros. Esta denominação é indicada pela International Society for Human and Animal Mycology desde 1992.^[52]

As micoses subcutâneas representam um grupo heterogêneo de infecções, resultantes, geralmente, da penetração direta do fungo na pele através de traumatismo, espalhando-se pelos tecidos próximos à área de implantação.^[53] Juntamente com a esporotricose e o micetoma, a cromoblastomicose é uma das micoses subcutâneas mais frequentemente encontrada.^[54-56]

A cromoblastomicose é uma micose cutânea e subcutânea, crônica, progressiva, causada pela implantação transcutânea de diversos gêneros de fungos dematiáceos. Todos os agentes causadores geram as mesmas formas parasitárias, conhecidas como células muriformes, fumagóides ou corpos de Medlar. A marca desta doença é a presença destas estruturas, incorporadas em uma reação tecidual granulomatosa e supurativa.^[4,5,56,57] Esta micose também é caracterizada por lesões nodulares verrucosas, geralmente envolvendo os membros inferiores. A maioria dos pacientes são homens imunocompetentes, trabalhadores agrícolas com história de trauma causado por madeira ou vegetação.^[38]

2.1.2 Epidemiologia

A cromoblastomicose tem uma distribuição mundial e aparece com maior frequência nas zonas rurais das regiões de climas tropicais e subtropicais da América Latina, África e Ásia. Os países com as maiores taxas de prevalência relatadas são Madagascar, África do Sul, Brasil e Costa Rica. No continente americano, casos também foram diagnosticados nos Estados Unidos, México, Venezuela, República Dominicana, Cuba e Colômbia. ^[57-60] O Brasil merece destaque por ser o país do continente americano com o maior número de casos. ^[2,60] No Extremo Oriente, os casos foram mais frequentemente relatados do Japão, China, Índia e Malásia. ^[61-65] Os poucos casos relatados na Europa têm sido da Rússia, França, República Checa, Romênia, e da ex-Alemanha Oriental. ^[2,3,66,67] Casos são vistos com frequência nos países localizados nas zonas central e sul do continente Africano. ^[68,69] Alguns casos também foram relatados na Austrália. ^[70]

No Brasil, a cromoblastomicose apresenta casos distribuídos por todas as regiões geográficas. Entretanto, Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Estados da região Amazônica são áreas endêmicas. ^[1,8,71-74]

No Rio Grande do Sul, foram levantados 100 casos de pacientes entre 1963 e 1998. Houve a predominância da doença no sexo masculino, entre lavradores e as lesões localizadas nos membros inferiores. A maioria dos casos foi proveniente da região norte do Estado. ^[8] Matte et al., ^[71] realizaram a revisão de 12 casos entre 1988 e 1995, também oriundos deste Estado, e encontraram resultados semelhantes. Em outros dois trabalhos prévios realizados no Estado por Bopp e Bernadi ^[75] e Londero e Ramos ^[76], os quais revisaram 130 e 73 casos, respectivamente, também verificaram a predominância de pacientes da região norte

do Estado. Bopp e Bernardi associaram a presença dos agentes da cromoblastomicose no Rio Grande do Sul aos fatores climáticos, revestimento e composição do solo, os quais poderiam favorecer a proliferação destes fungos. Ainda foi destacado que nesta região predomina a pequena propriedade rural, sendo um hábito do agricultor executar o trabalho descalço, com contato direto na terra, o que favorece ainda mais a contaminação por estes agentes etiológicos.

A cromoblastomicose é essencialmente uma doença de adultos, cuja frequência máxima é encontrada após a idade de 30 anos, um fato que pode ser explicado, em parte, pela cronicidade da doença. Trata-se de uma infecção ocupacional que afeta principalmente homens. Este fato está relacionado com fatores hormonais e genéticos, que podem desempenhar um papel na adaptação do hospedeiro fúngico nos tecidos. [8,56,77,78] A maioria dos pacientes é de baixa renda e trabalham em atividades relacionadas com a agricultura, como por exemplo, agricultores, cortadores de madeira e vendedores de produtos agrícolas. Uma característica constante é a falta de calçados de proteção e vestuário adequado. Deste modo, o principal sítio anatômico afetado são os membros inferiores. [2,3,8] Esta doença ocorre com igual frequência em pessoas da Europa, Ásia, América Latina e da África, bem como seus descendentes. Assim, todas as raças parecem ser suscetíveis. [78,79] Pode afetar qualquer idade, mas é raramente vista antes da adolescência, além de ser incomum entre as mulheres. [3,80]

2.1.3 Etiologia

A cromoblastomicose é causada por fungos filamentosos da família *Herpotrichiellaceae*. Os principais agentes etiológicos são: *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii*. Dentre os menos comuns podemos destacar *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquaspersa* e *Exophiala spinifera*. Todos estes agentes

são ascomicetos e pertencem a uma única ordem, a *Chaetothyriales*. Estes fungos assemelham-se na pigmentação, estrutura antigênica, morfologia, propriedades fisiológicas e formação de conídios. [4-6]

No mundo todo, a identificação gênero *Fonsecaea* dava-se exclusivamente pela visualização os corpos de frutificação, através de microcultivo do fungo. Entretanto, houve uma recente revisão taxonômica deste gênero [15-19] e com base em dados obtidos por sequenciamento, atualmente são reconhecidas cinco espécies: *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica*, *F. multimorphosa* e *F. brasiliensis*. Estas espécies são morfologicamente idênticas, porém com aspectos clínicos diferenciados. Apenas as três primeiras espécies foram encontradas como causadoras de micoses em humanos. *F. pedrosoi* e *F. nubica* são encontradas restritas à pele e ao tecido subcutâneo, causando cromoblastomicose, enquanto *F. monophora* aparece também causando abscessos cerebrais, acometimento de linfonodos e na bile. [38,81,82] Dentre as metodologias mais empregadas para a identificação molecular dos agentes da cromoblastomicose está o sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal. [20,21,82] A identificação molecular de isolados de agentes da cromoblastomicose é importante para se conhecer a real epidemiologia desta doença. Em trabalhos em que foi realizada a avaliação molecular destes agentes originários do Brasil, foram encontrados resultados discrepantes. Em estudo realizado por Mouchalouat et al., [73] que avaliou 18 casos de cromoblastomicose, oriundos da região sudeste do País, encontrou em 14 destes, agentes do gênero *Fonsecaea*, sendo confirmado molecularmente, que todos eram *F. pedrosoi*. Najafzadeh et al. [83] realizaram um estudo de epidemiologia molecular com o gênero *Fonsecaea* no mundo, encontraram dentre 13 isolados brasileiros, de origens clínica e ambiental, 2 *F. nubica*, 4 *F. pedrosoi* e 7 *F. monophora*. No mundo,

F. pedrosoi apareceu em número semelhante à *F. monophora* (36 vs 34) e *F. nubica* em número bem inferior, com apenas 9 isolados.

Em outro estudo que utilizou 7 amostras brasileiras do gênero *Fonsecaea*, através de análise filogenética, encontraram apenas 2 *F. pedrosoi*, 1 *Fonsecaea* sp. e 4 *F. monophora*.^[21] No Rio Grande do Sul, em trabalho realizado por nosso laboratório, verificamos o primeiro isolado de *F. monophora* deste Estado e o primeiro caso por este agente causal com recidivas das lesões no Brasil.^[84]

2.1.4 Habitat

Os fungos que causam a cromoblastomicose são encontrados em espinhos de plantas xerófilas, no solo, vegetação em decomposição, sob forma saprofítica.
[3,7,54,85,86, 87]

Estudos demonstraram o isolamento dos diversos tipos de fungos causadores da cromoblastomicose em várias espécies vegetais. No Brasil, Salgado et al.^[85] identificou *F. pedrosoi* nos espinhos de *Mimosa pudica*, popularmente conhecida como dormideira ou não-me-toque. Silva et al.^[86] sugeriram relação entre a ocorrência de lesões nas nádegas e o hábito de sentar nas cascas de babaçu (*Orbignya phalerata*). O isolamento de *F. pedrosoi* também foi verificado em diferentes amostras desta espécie vegetal, tais como troncos e folhas em decomposição. *P. verrucosa* foi isolada em diversos países de materiais como plantas, gramíneas e solo.^[88] Já *C. carrionii* foi encontrado em cactos e espinhos de uma zona endêmica semi-árida da Venezuela.^[89] Tanto *F. pedrosoi* quanto *C. carrionii* são encontrados em regiões tropicais e subtropicais, entretanto *F. pedrosoi*

está mais presente em áreas úmidas, enquanto que *C. carrionii* é mais prevalente em climas semi-áridos.^[90]

2.1.5 Patogenia

A infecção geralmente é adquirida após traumatismo da pele e inoculação acidental percutânea de conídios ou hifas.^[5,85] Geralmente os pacientes não se recordam de traumas ou injúrias na pele, devido ao fato de que as manifestações da doença ocorrem algum tempo após a exposição ocupacional.^[2,8,74] Uma vez incorporado no tecido, o fungo transforma-se na fase parasitária característica da doença, uma estrutura multicelular, com 4 a 12 μm de diâmetro, de paredes espessas e de cor acastanhada, denominada de célula muriforme ou fumagóide. Esta estrutura, quando madura, desenvolve septos paralelos e perpendiculares, os quais levam à sua fragmentação e consequente multiplicação.^[1,2,56] Tais células constituem as formas fúngicas presentes no hospedeiro e representam uma forma vegetativa intermediária entre o conídio e a hifa. Em seres humanos, não é conhecido em quanto tempo esse dimorfismo ocorre. Além disso, a diferenciação das hifas ou conídios em células muriformes, no tecido do hospedeiro, é um aspecto biológico interessante, cujo mecanismo ainda não está totalmente esclarecido.^[2,91] Em meio de cultura específico é possível obter tais células em 48h.^[92]

A melanina pode desempenhar um papel importante na patogênese de infecções causadas por fungos dematiáceos. Este pigmento que está presente na parede das células parasitárias e vegetativas dos agentes da cromoblastomicose, tendo como função proteger o fungo contra fatores ambientais agressivos como luz, acidez e calor. Além disso, atua também como um fator de virulência, estando

relacionada com o padrão de resposta inflamatória granulomatosa e à cronicidade da doença.^[1] Já foi verificado que os neutrófilos não conseguem combater fungos dematiáceos, por meio de oxidação, devido à presença da melanina.^[93] Além disso, o fungo *F. pedrosoi* não é digerido por macrófagos mesmo, estes últimos, estando ativados. Entretanto, o englobamento do fungo por estas células retarda a germinação e o desenvolvimento das hifas.^[94] As lesões consistem de abscessos, com resposta granulomatosa tecidual, não contagiosas, crônicas e de difícil manejo, especialmente em infecções avançadas.^[56] Os componentes granulomatosos e supurativos dos tecidos infectados consistem de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e células de Langerhans. As células fúngicas podem estar livres, no interior de células fagocíticas ou em ambas as formas.^[95] Em relação à natureza resistente das células escleróticas, já foi observado que estas células permanecem viáveis por até 18 meses após a coleta do tecido do paciente.^[96] A infecção evolui de forma lenta no transcorrer dos anos, à medida que o agente etiológico adapta-se às condições do hospedeiro.^[56]

O alto índice de fibrose em conjunto com o infiltrado inflamatório crônico aumenta a suscetibilidade de ocorrência de infecções secundárias e leva ao desenvolvimento de linfoedema nos locais afetados. Em decorrência do linfoedema, ocorre uma diminuição da circulação local, o que gera atrofia da pele e dos tecidos moles, causando deformidades e anquilose das articulações. Isso conduz à invalidez permanente do membro afetado.^[2]

2.1.6 Características Clínicas

As lesões geralmente são unilaterais, isoladas e restritas aos membros inferiores. Em regiões cujo principal agente etiológico é *C. carrionii*, as lesões podem ocorrer nos membros superiores.^[56,90,97] A lesão inicial apresenta-se como uma pequena lesão de pele, com superfície rosada, lisa e papular. As pápulas aumentam gradualmente ao longo de algumas semanas, podendo haver a formação de uma superfície escamosa. Com o tempo, a lesão pode evoluir para vários tipos de lesões de pele conduzindo a um aspecto clínico polimórfico.^[69] Para melhor descrever os aspectos clínicos da cromoblastomicose, várias classificações foram propostas por diferentes autores durante o século passado.^[98-100] Entre estas, a classificação introduzida por Carrión,^[99] é a mais aceita e caracteriza as lesões em cinco tipos diferentes: nodular, placa, tumoral, cicatricial e verrucosa. Os tipos nodular, tumoral, placa e verrucosa (Figura 1) são os mais frequentes.^[5,55] Em casos avançados, mais que um tipo de lesão podem ser observadas no mesmo paciente. Além disso, as lesões podem ser classificadas de acordo com sua gravidade: leve, moderada e severa. Este último tipo tende a ser não responsiva ou responder lentamente à terapia antifúngica.^[56,88,101]

Figura 1: Principais tipos de lesões observadas na cromoblastomicose: A) nodular, B) verrucosa, C) tumoral e D) placa.



Fonte: Adaptado de Martínez & Tovar 2007, Ameen, 2009, Queiroz-Telles et al.

2009. [2,55,102]

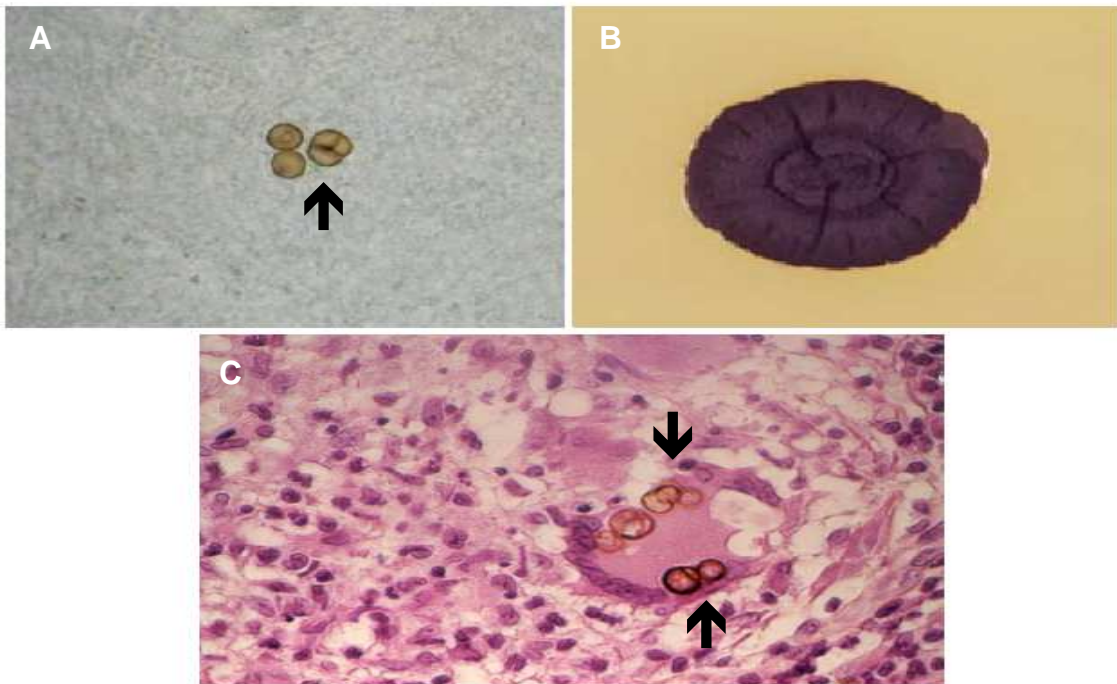
2.1.7 Diagnóstico

Independente do agente causador, esta micose é considerada bem definida e individualizada no ponto de vista clínico, anatomopatológico e micológico. O achado característico nos raspados de pele é a presença das células escleróticas visualizadas através do exame micológico direto com KOH (Figura 2 A). Hifas também podem ser encontradas. As culturas podem ser obtidas por inoculação de amostras da pele lesionada em agar Sabouraud dextrose ou agar Sabouraud dextrose com antibióticos, e incubadas a 25 – 28 °C, sendo que estes microorganismos são de crescimento lento (acima de 10 dias) (Figura 2B). Todos os agentes, com exceção de *E. spinifera* produzem colônias aveludadas, que inicialmente são verde oliva e mais tarde tornam-se negras.^[9, 79] As colônias de *E. spinifera* apresentam-se inicialmente com aspecto leveduriforme e com o passar do tempo tornam-se filamentosas, sendo que em ambas as fases as colônias são de coloração negra.^[14]

Os raspados ou material de biópsia devem ser coletados de áreas onde manchas escuras são visíveis na superfície da pele lesionada, o que contribui para um melhor diagnóstico.^[3]

As biópsias coradas com hematoxilina-eosina demonstram um infiltrado inflamatório caracterizado por células multinucleadas, fibrose, acantose, papilomatose, hiperqueratose e hiperplasia pseudo-epiteliomatosa. As células escleróticas também são visualizadas por este método (Figura 2 C).^[2,79]

Figura 2: A) Visualização de células escleróticas por exame micológico direto (x 40);
 B) Cultura de agente da cromoblastomicose com crescimento de 30 dias em Agar Sabouraud. C) Corte histológico com célula de Langerhans contendo várias células muriformes (coloração Hematoxilina-Eosina (H&E), x 100).

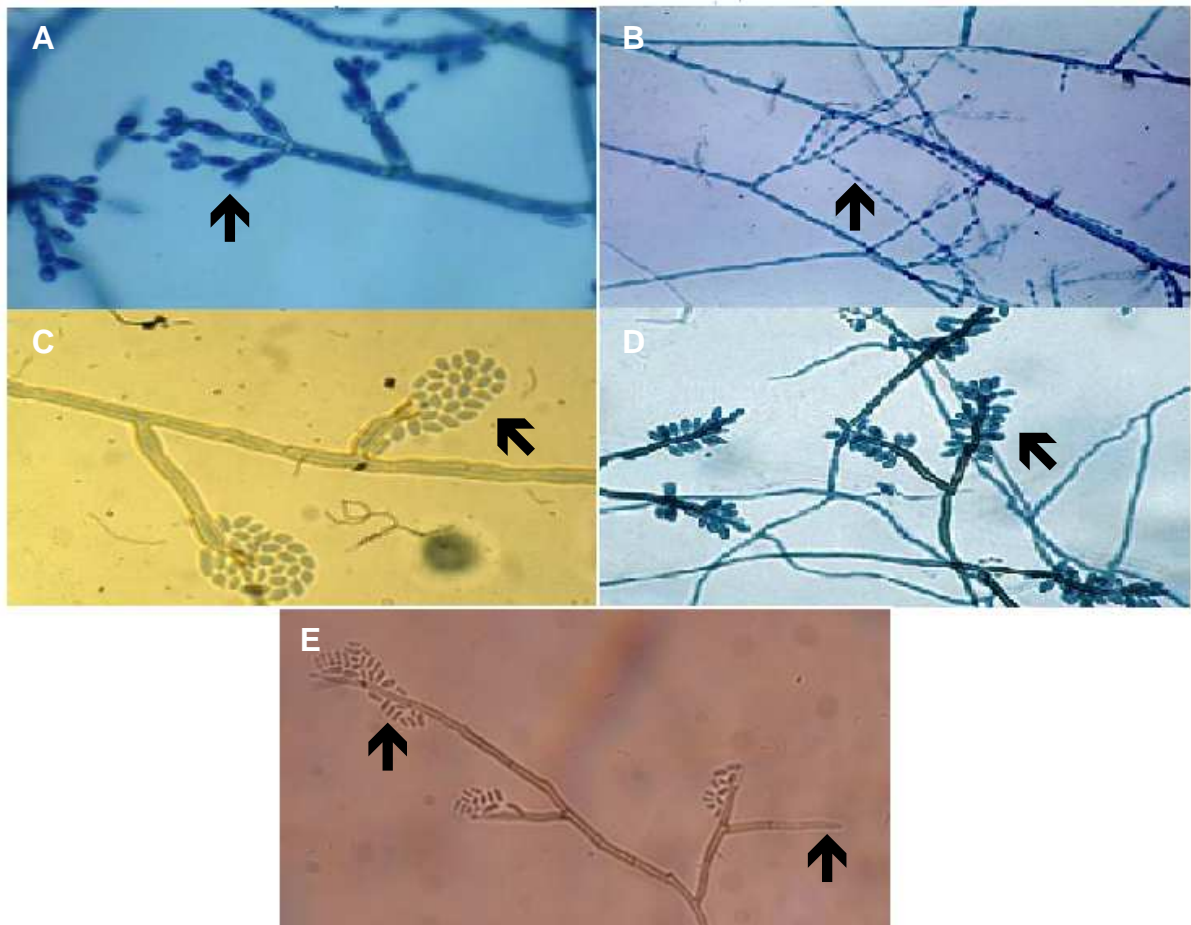


Fonte: Adaptado de Martínez e Tovar, 2007 e Zaitz et al. 2004.^[2,103]

Para fins de identificação da espécie, tradicionalmente é realizada através da visualização microscópica das estruturas de reprodução assexuada, obtidas através da técnica de microcultivo. Em isolados de *P. verrucosa* (Figura 3 C) é possível verificar a presença de fiálides com fialoconídios; Em relação às espécies do gênero *Fonsecaea* spp. (Figura 3 A) são visualizadas predominantemente células conidiogênicas com curtas cadeias de conídeos, enquanto que para *C. carrionii* (Figura 3 B) as cadeias de conídios são exclusivamente longas. No microcultivo de *R. aquaspersa* (Figura 3 D) são vistas estruturas denteadas que correspondem aos conídios simpodiais originários das células conidiógenas. Em *Fonsecaea* spp. é possível visualizar também estruturas características dos gêneros *Cladosporium*,

Rhinocladiella e *Phialophora*. *E. spinifera*, que é um agente causador tanto de cromoblastomycose quanto de feohifomicose, forma estruturas retas e compridas, semelhante a espinhos, com conidióforos septados. Os conídios são obovóides e localizados nos vértices das células conidiogênicas, bem como em locais intercalares (Figura 3E). [3,101,103]

Figura 3: A) Corpo de frutificação predominante de *Fonsecaea* spp. (azul de lactofenol, x 40) B) Corpos de frutificação de *C. carrionii* (azul de lactofenol, x 100) ; C) Estrutura de reprodução assexuada de *P. verrucosa* (x 100); D) Estrutura de reprodução assexuada de *R. aquaspersa* (azul de lactofenol, x 40); E) Corpo de frutificação de *E. spinifera* (x 40).



Fonte: Adaptado de Martínez & Tovar, 2007; Zaitz et al. 2004; Daboit et al. 2012.

Mais recentemente, técnicas de biologia molecular ganharam cada vez mais importância na definição da taxonomia exata do agente causal.^[15]

A técnica de “rolling circle amplification” (RCA) foi desenvolvida para a detecção rápida de fungos do gênero *Fonsecaea*.^[104]

O sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal é utilizado para um rápido diagnóstico clínico, ambiental, e em estudos retrospectivos com amostras arquivadas.^[14,16,84]

Um estudo com um antígeno metabólico denominado a cromomicina foi realizado a fim de detectar hipersensibilidade tardia a *F. pedrosoi* em pacientes com cromoblastomicose. Este teste apresentou sensibilidade de 90% e especificidade de 98,8%. O trabalho sugere que este antígeno pode ser utilizado como um diagnóstico auxiliar e também em estudos epidemiológicos a fim de determinar a prevalência da cromoblastomicose em áreas endêmicas.^[105]

Os testes sorológicos tais como Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), podem ser úteis na avaliação da resposta terapêutica, mas, como o sequenciamento, não são amplamente disponíveis em áreas endêmicas.^[10,106]

Em relação a diagnósticos diferenciais, os mais importantes são tuberculose verrucosa, esporotricose fixa, lacaziose, leishmaniose, blastomicose, feohifomicose, paracoccidioidomicose e carcinoma de células escamosas. O exame microscópico direto de raspado de pele ou biópsia deve ser suficiente para descartar estas outras patologias, no entanto, a identificação cultural é o único meio confiável para o diagnóstico definitivo.^[3,9]

2.1.8 Tratamento

A cromoblastomicose é uma doença associada a baixas taxas de cura e grande número de recidivas, particularmente em casos crônicos com lesões de grande extensão. A escolha do tratamento está relacionada com agente etiológico, o tamanho e extensão das lesões, a topografia clínica, além da presença de complicações, tais como fibrose dérmica e edema, que atuam reduzindo os níveis de fármaco nos tecidos. [102,107]

É relatado que infecções por *Fonsecaea* spp. são mais difíceis de serem tratadas quando comparadas às causadas por *C. carrionii* e *P. verrucosa*. [105, 108]

O objetivo do tratamento de lesões pequenas ou iniciais deve ser a cura. No entanto, no caso de infecções extensas o objetivo é de reduzir e controlar doença, impedindo a difusão e prevenindo complicações. A cura clínica é definida como a extinção completa das lesões com cicatrizes e a cura micológica é definida como microscopia e cultura negativas. [102]

Assim como outras micoses endêmicas, estudos clínicos comparativos não estão disponíveis, muito em função da natureza esporádica da doença. Deste modo, não há tratamentos de escolha para esta micose, mas uma série de opções terapêuticas, eleitas com base em casos clínicos. O tratamento pode ser dividido em três grupos: tratamentos físicos, quimioterápicos e a combinação dos dois primeiros grupos. [55]

Nas fases iniciais da doença, as lesões respondem à excisão cirúrgica, mas à medida que aumenta a severidade, melhores resultados são alcançados com antifúngicos sistêmicos. A terapia com fármacos por seis meses ou menos pode

levar a resultados clínicos favoráveis, entretanto recidivas são comuns antes e após o tratamento. [3,10]

Dentre as terapias físicas, destacam-se a utilização de curetagem, eletrodissecação e criocirurgia. Esta modalidade de tratamento tem a vantagem de ter menor custo e ser de fácil administração. Pode ser uma opção útil para pacientes que não podem utilizar a medicação sistêmica. [10]

Com relação aos fármacos antifúngicos, ainda hoje poucas opções estão disponíveis. A terapia com estes agentes consiste em longos períodos com doses elevadas. São utilizados no tratamento desta micose a 5-fluorocitosina, o itraconazol, a terbinafina, o fluconazol, o tiabendazol, o cetoconazol, e a anfotericina B. [69,109-112] Todos estes agentes estão associados a efeitos adversos significativos e requerem monitoramento apropriado das funções hepática e renal. [113] Na última década houve o desenvolvimento de novos representantes da classe dos azólicos, o voriconazol e o posaconazol, que também passaram a ser utilizados em casos de cromoblastomicose, mas a experiência de tratamento é limitada pelo custo elevado destes antifúngicos. [10,114] Até o presente momento os fármacos com melhores resultados no tratamento desta micose são o itraconazol e a terbinafina. [115] A anfotericina B não é considerada uma terapia de primeira linha devido à sua significativa nefrotoxicidade, o que não permite a sua utilização em longo prazo. A forma recomendada de utilização é a administração intravenosa associada com aplicações intralesionais. [2,69,55] Atualmente esquemas com fluorocitosina em monoterapia, tiabendazol, fluconazol e cetoconazol não são frequentemente empregados. [55]

Para o adequado manejo do paciente com cromoblastomicose, deve-se considerar o estado geral de saúde do paciente, as suas condições socioeconômicas, bem como a sua adesão à terapêutica. Além disso, o monitoramento quanto ao surgimento de resistência aos fármacos bem como o tratamento de comorbidades e complicações deve ser realizado, pois nenhum dos tratamentos disponíveis atualmente produz resultados completamente satisfatórios em todos os casos. [2]

2.1.9 Ensaios de suscetibilidade aos antifúngicos

Os testes de suscetibilidade antifúngica não são tão comumente realizados como os testes de suscetibilidade antibacteriana. A utilização de métodos confiáveis e reprodutíveis de avaliação da suscetibilidade antifúngica, bem como mais estudos sobre o papel destes testes na assistência ao paciente, são necessários a fim de fornecer informações que podem ser traduzidos em resultados clínicos positivos. [116]

Existem poucos dados sobre a sensibilidade *in vitro* de fungos dematiáceos aos fármacos disponíveis [13,117-122] e ainda menos sobre a utilização de combinações de antifúngicos *in vitro* para estes fungos. [122-126]

O primeiro teste padronizado de avaliação de atividade antifúngica surgiu em 1997, para leveduras. Antes disso, os testes de suscetibilidade para fungos não possuíam nenhuma regulamentação e sem padronização pelos diferentes laboratórios, o que dificultava correlacionar resultados. A partir de então, testes para fungos dematiáceos, em especial os agentes da cromoblastomicose, começaram a ser realizados com adaptações, mas geralmente com um número reduzido de isolados. [126] Em 2002 foi publicada pelo National Committee for Clinical Laboratory

Standards (NCCLS), a primeira edição do protocolo de testes de suscetibilidade para fungos filamentosos, mas nada constava a respeito de fungos dematiáceos.^[127] No documento M38-A2 emitido em 2008, pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), foram inclusos os fungos do gênero *Exophiala* e *Cladophialophora*.^[128] Com base nas informações contidas neste último protocolo, apenas quatro estudos foram realizados. Através destes estudos, pode-se verificar que não há diferença de suscetibilidade entre as diferentes espécies do gênero *Fonsecaea*. Além disso, há diferença de suscetibilidade aos diferentes antifúngicos nos diferentes gêneros.^[119-122] Concentrações inibitórias Mínimas (CIM) $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ geralmente são utilizadas como um indicador de potencial suscetibilidade para a maioria dos fármacos utilizados no tratamento de infecções por fungos dematiáceos. Tipicamente, CIM mais baixas sugerem melhor atividade.^[11]

Ensaio neste sentido são importantes para conhecer o perfil de suscetibilidade dos isolados, identificar microrganismos resistentes e muitas vezes prever a resposta clínica, principalmente pelo fato da cromoblastomicose ser uma doença em que o tratamento não é padronizado.^[12-14]

2.1.10 Modelos animais de cromoblastomicose

Os avanços conquistados pela micologia médica são provenientes, em grande parte, de estudos em modelos animais. A realização de testes *in vitro* para avaliar a atividade de fármacos antifúngicos permite definir concentrações efetivas em meios de cultura previamente definidos. Porém, pela limitação dos testes em simular os aspectos complexos envolvidos no estudo *in vivo* faz-se necessário determinar a eficácia destes antifúngicos utilizando-se modelos animais.^[22]

Há poucos estudos em animais com agentes da cromoblastomicose. Um grande desafio no caso desta micose é encontrar um modelo adequado e reprodutível para cromoblastomicose experimental crônica, que seria de grande utilidade para o estudo da resposta imunológica e para testar novas terapias antifúngicas. A presença de formas parasitárias conhecidas como células escleróticas nos tecidos é um sinal típico da forma humana da doença. No entanto, as formas de fungos envolvidos em estabelecer a infecção e o mecanismo da sua adaptação ao parasitismo permanecem desconhecidas.^[129] Neste sentido, há uma grande dificuldade em se obter estes modelos.

Há relativamente poucos modelos de cromoblastomicose na literatura. Um dos primeiros modelos animais de cromoblastomicose foi desenvolvido por Borelli.^[130] Foi realizada inoculação intraperitoneal de *F. pedrosoi* e *C. carrionii* em camundongos de 7 dias. Nas primeiras semanas, após a inoculação dos patógenos, estes foram encontrados em grande parte do tórax e órgãos abdominais. Mais tarde, *C. carrionii* só foi encontrado nos pulmões como células escleróticas, e no abdômen. *F. pedrosoi* manteve-se em quase todos os órgãos, entretanto na forma de hifas. No final do primeiro mês, os nódulos escuros tornaram-se visíveis ao longo da cauda, nas articulações, no escroto e na face dos animais.

Outro estudo realizou um modelo murino de infecção com *F. pedrosoi* em animais pré e pós-tratados com cortisona. As características das lesões apresentadas por este modelo não estavam em total conformidade com a infecção por *F. pedrosoi* em humanos em termos de localização anatômica das lesões. Algumas semelhanças são de que as lesões produzidas localizavam-se na pele e tecido subcutâneo, além da presença de células escleróticas. Neste modelo,

verificaram que 5-fluorocitosina em altas doses reduziu ou inibiu totalmente os sintomas crônicos da cromoblastomicose. [131,132]

Cardona-Castro et al. [129] realizou um modelo animal com camundongos BALB/c e testou vários locais de inoculação. Elegeram a inoculação abdominal, pois apenas neste local os nódulos permaneceram. Em exame histopatológico encontraram a presença de hifas e células escleróticas. Na avaliação da atividade de antifúngicos, o itraconazol levou à cura micológica 44% dos animais testados.

O desenvolvimento de cromoblastomicose crônica foi obtido em modelo murino com camundongos imunocompetentes realizado por Cardona-Castro & Agudelo-Flóres. [133] Foi encontrado que a inoculação em 5 pontos da região abdominal com um inóculo contendo 10^6 UFC/mL, foi a melhor condição para o desenvolvimento de cromoblastomicose crônica.

Células escleróticas também foram visualizadas no fígado e no baço, quando administrado 1mL de um inóculo contendo 10^6 UFC/mL e realizada uma avaliação após 30 e 60 dias da inoculação inicial. [134]

Um inóculo preparado a partir de fungo cultivado por longo período (6 meses) foi utilizado na realização de um modelo de cromoblastomicose crônica. Camundongos BALB/c foram infectados por via subcutânea nas patas, sendo que lesões ativas foram observadas até sete meses após a infecção, em particular nos animais inoculados em ambas as patas. Os cortes histológicos revelaram características fortemente semelhantes com a forma humana da doença, tais como a hiperplasia do tecido, granulomas com microabscessos e células escleróticas. [135] Em outro trabalho do mesmo grupo foi verificada a infecção prolongada após a co-estimulação antigénica por inoculação do fungo *F. pedrosoi* (10^6 UFC/mL) em dois

locais diferentes em três tipos de camundongo (BALB/c, Swiss e C57BL/6). Usando este modelo murino de infecção, mostrou-se que a indução da infecção em mais de um local simultaneamente (pata e peritônio) conduziu a um aumento no tempo de infecção. ^[136]

Xie e colaboradores ^[137] também obtiveram a infecção crônica em ratos Wistar fêmeas. Foi mimetizado o mesmo quadro clínico de humanos com a aplicação intracutânea do inóculo, na região dorsal dos animais, o que somente foi obtido neste estudo.

Calvo et al. ^[138] não observaram sinais de cromoblastomicose após 4 meses da inoculação de 10^6 UFC/mL, pela via intraperitoneal em camundongos imunocompetentes. A inoculação subcutânea do fungo em camundongos imunocompetentes produziu lesões, contudo, eles curavam-se espontaneamente após algumas semanas. O modelo escolhido foi a inoculação subcutânea em camundongos CD-1 atímicos com o fungo *F. pedrosoi*, uma vez que este método foi capaz de produzir uma infecção crônica nos animais, com a presença de lesões típicas de cromoblastomicose na área de inoculação. Tais lesões persistiram por pelo menos 1 ano após a inoculação. Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo, utilizando camundongos atímicos e um inóculo produzido a partir de uma cepa de *C. carrionii* com 10^7 UFC/mL, lesões típicas, bem com células escleróticas e hifas foram visualizadas em até 4 meses da inoculação. ^[139]

2.2 Feohifomicose

A feohifomicose é um grupo heterogêneo de infecções fúngicas, causadas por uma variedade de fungos pigmentados. É uma doença rara, sendo mais comum em indivíduos imunocomprometidos. Esta infecção afeta tecidos superficiais, tais como a pele, córnea e o tecido subcutâneo. Também pode acometer tecidos profundos, tal como o cérebro ou apresentar-se na forma disseminada. ^[140]

A feohifomicose cutânea e subcutânea é similar à cromoblastomicose em vários aspectos, entretanto são diferenciadas pelo fato de que na primeira não há a transformação dos propágulos dos fungos nos tecidos em células muriformes. Em exame micológico direto são encontradas hifas melanizadas e por vezes blastoconídeos, nos casos de feohifomicose. ^[141]

Durante as últimas décadas, a feohifomicose tem sido atribuída a mais de 100 espécies e 60 gêneros de fungos em diversas manifestações clínicas, que variam de ceratite e nódulos subcutâneos solitários à infecção disseminada fatal. ^[139] A maioria das espécies é considerada patógenos oportunistas, embora alguns possam ser agentes patogênicos verdadeiros. ^[141, 142]

A feohifomicose é vista em todo o mundo, mas é mais comum em climas tropicais e subtropicais. ^[143] Ocorre pela implantação traumática de fungos dematiáceos presentes em solos e vegetações. É esporádica, sendo que geralmente acomete homens idosos com atividade vinculada à terra ou a material vegetal, como por exemplo agricultores e carpinteiros. Pode se manifestar tanto em indivíduos imunocompetentes quanto em imunocomprometidos. ^[143-145] Quando não ocorre de forma disseminada, é caracterizada por ser uma infecção crônica da derme e do tecido subcutâneo. Uma massa assintomática ou nódulo único no local

do trauma, que evolui até formar um abscesso cístico indolor. Eventualmente, placas eritematosas podem estar presentes. Os locais mais comuns de infecção são braços, pernas, mãos, pés e cabeça. ^[143,145,146]

Os tratamentos empregados nesta micose são o itraconazol e a anfotericina B. O posaconazol é utilizado em pacientes refratários a outros tratamentos. Excisão cirúrgica completa também é empregada. ^[143,145-147] Dentre os fungos causadores mais frequentes estão *Exophiala jeanselmei*, *Exophiala moniliae*, *Bipolaris* spp., *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* e *Cladophialophora* spp. ^[146]

Um fungo causador esporádico de feohifomicose é *E. spinifera*, que pode aparecer acometendo tanto indivíduos imunocompetentes quanto imunocomprometidos, causando lesões cutâneas e subcutâneas e até mesmo a forma disseminada. ^[14,148] É relatado que este fungo também foi encontrado como causador de cromoblastomicose. ^[6] Na literatura de língua inglesa são relatados apenas 26 casos de infecções por este agente etiológico no mundo inteiro. ^[14, 149-152]

No Brasil, foram relatados três destes casos. ^[14,148,153] Em poucos casos foi realizada a identificação molecular do fungo ou a avaliação da suscetibilidade do mesmo aos antifúngicos. ^[14,149,154]

2.3 Fármacos antifúngicos

2.3.1 Anfotericina B

Os poliênicos macrolídeos compõem a classe mais antiga de agentes antifúngicos. A anfotericina B, o principal representante desta classe, foi isolada pela primeira vez em 1959 de culturas de *Streptomyces nodosus*. É uma molécula cíclica

alongada constituída por domínios polihidroxiil hidrofílico e poliênico hidrofóbico (Figura 4A). Tem como mecanismo de ação a formação complexa com o ergosterol, presente na membrana plasmática fúngica, o que produz poros ou canais. Isso resulta em um aumento da permeabilidade da membrana, levando a grande perda de conteúdo intracelular e à morte da célula (Figura 4B). A anfotericina B possui também alta afinidade ao colesterol, o que resulta em alta toxicidade contra as células dos mamíferos.^[37,155]

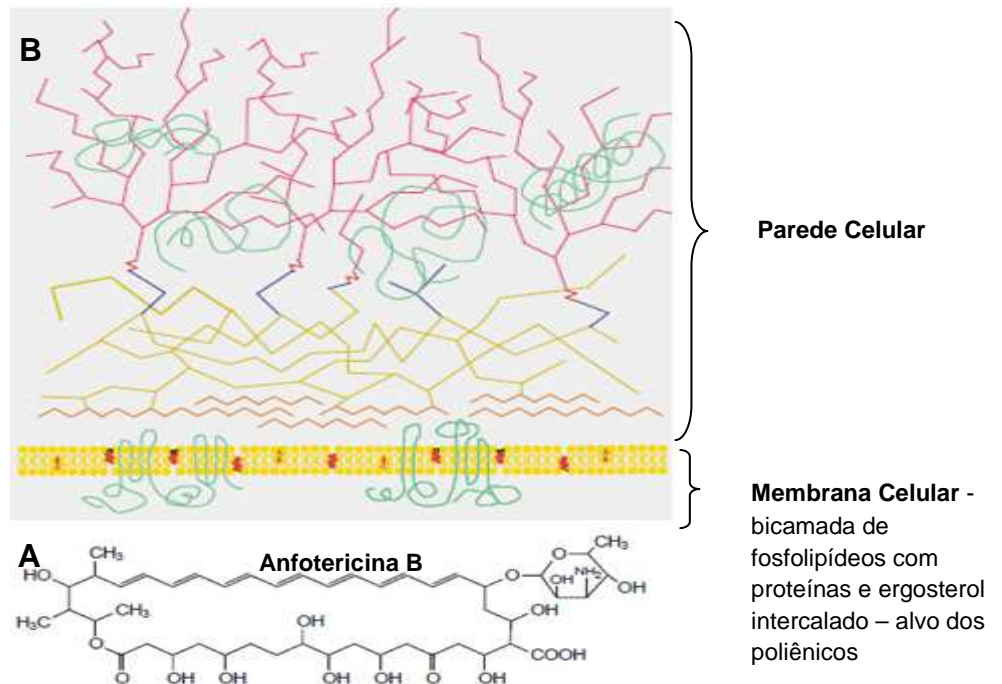
Pelo fato deste fármaco ser pouco hidrossolúvel, ele é pouco absorvido quando administrado por via oral. Desta forma, a anfotericina B é geralmente administrado pela via intravenosa. Para solubilizá-la é adicionado na formulação um agente tensoativo denominado desoxicolato de sódio. Esta combinação é a formulação mais utilizada deste fármaco na prática clínica.^[156]

A anfotericina B é considerada o padrão ouro da terapia antifúngica, apesar do desenvolvimento de novos fármacos.^[157,158]

Pelo seu mecanismo fungicida apresenta maior espectro que os demais antifúngicos clinicamente disponíveis. Possui satisfatória atividade *in vitro* contra os fungos dematiáceos de maior importância clínica, podendo ser utilizado em pacientes instáveis, com graves infecções.^[11,126]

Entretanto, é associada com alta toxicidade, o que limita seu uso. Os principais efeitos adversos são nefrotoxicidade, hipocalcemia, hepatotoxicidade e reações relacionadas com infusão (febre, calafrios, hipóxia).^[32]

Figura 4: Mecanismo de ação e estrutura molecular da anfotericina B: A) Molécula; B) Local de ação do antifúngico.



Fonte: Adaptado de Odds et al. 2003. ^[156]

2.3.2 Itraconazol

Os antifúngicos azólicos são uma grande classe de compostos sintéticos heterocíclicos em uso clínico, que atuam inibindo a lanosterol 14 α -demetilase, uma enzima do citocromo P- 450 fúngico, bloqueando, desta forma, a demetilação do lanosterol em ergosterol (Figura 5A). Isso resulta na depleção do ergosterol e sua substituição por esteróis anormais, o que altera a permeabilidade e a fluidez normal da membrana, com consequências secundárias para enzimas de membrana, como as envolvidas na síntese de parede celular. ^[37,159,160]

Com exceção do cetoconazol, os demais imidazólicos têm seu uso limitado ao tratamento de micoses superficiais. Já os triazólicos têm grande aplicação, tanto em micoses superficiais, quanto em sistêmicas. ^[161]

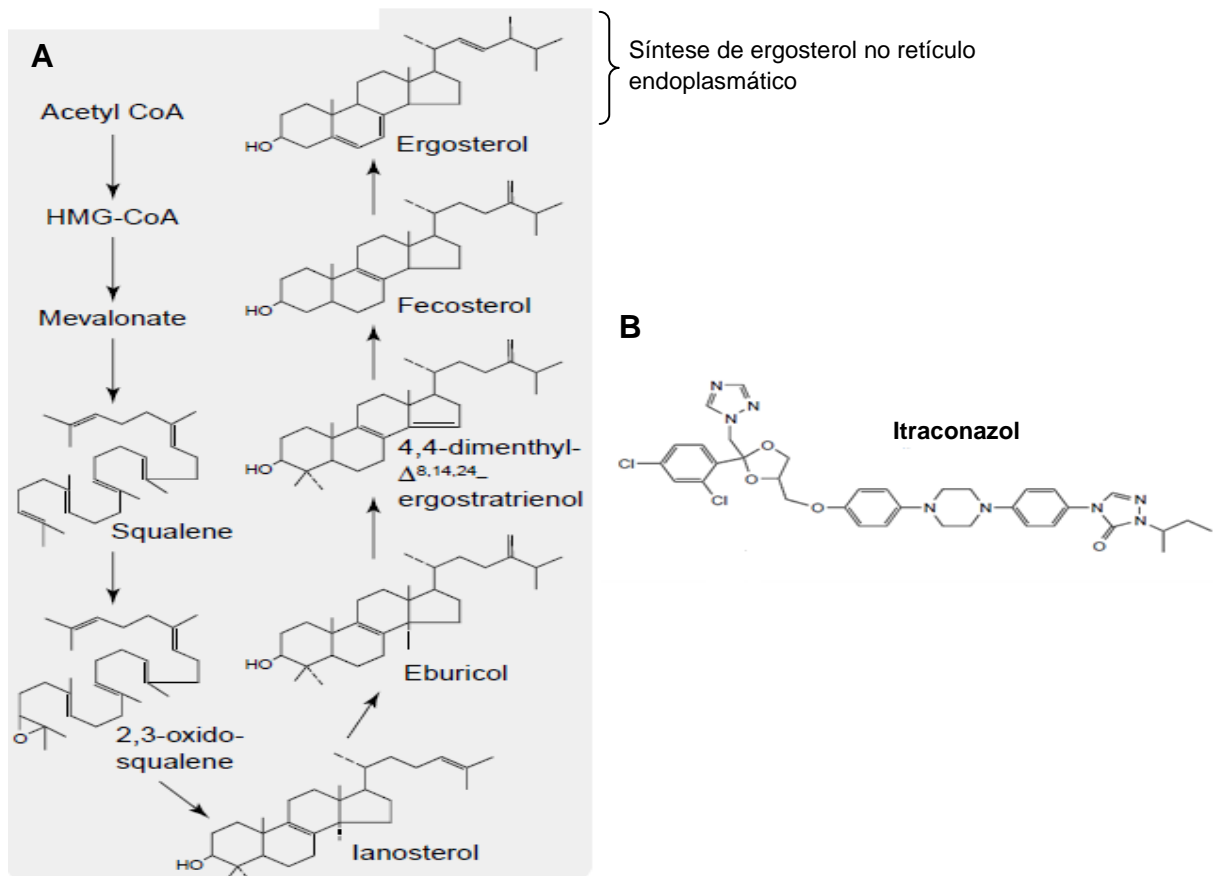
O itraconazol é um triazólico (Figura 5B) de primeira geração livre de efeitos endócrinos. ^[157] Apresenta um espectro mais amplo que o fluconazol, sendo ativo tanto contra leveduras quanto contra fungos filamentosos. ^[161] Devido a sua alta lipossolubilidade, alcança altas concentrações nos tecidos com alta concentração de lipídeos, enquanto que sua penetração nos fluidos aquosos é limitada. ^[29] Sua biodisponibilidade é errática quando administrado na forma de cápsulas por via oral. Recomenda-se, por isso, seu monitoramento terapêutico. De forma semelhante ao cetoconazol, este fármaco necessita da acidez gástrica e refeições ricas em lipídios para máxima absorção. ^[162] O desenvolvimento de preparações intravenosa e oral com absorção melhorada, fez com que os problemas relativos à biodisponibilidade fossem superados. ^[163,164]

O itraconazol é principalmente metabolizado pelo citocromo CYP450 3A4, e por essa razão, apresenta muitas interações medicamentosas com outros fármacos. Atua aumentando os níveis plasmáticos do tacrolimus, da ciclosporina, dos inibidores de protease, das estatinas, dos bloqueadores dos canais de cálcio, da digoxina, da quinidina, da carbamazepina e da pimozida, fazendo-se necessário um ajuste de dose destes medicamentos, pois podem alcançar níveis tóxicos. Ainda, diminui a concentração plasmática da isoniazida, da rifampicina, da rifabutina, da nevirapina e da fenitoína, além dos níveis de itraconazol serem aumentados por co-administração de macrolídeos e inibidores de protease. Deve-se por isso avaliar as potenciais interações medicamentosas antes de prescrevê-lo. ^[165]

Em relação aos efeitos adversos, o uso de itraconazol foi associado com casos sérios de hepatotoxicidade, incluindo falência hepática e óbito. O mecanismo para isso ainda permanece desconhecido, no entanto, sabe-se que é dose-dependente. Com o aumento da dose podem ser observados níveis elevados de

alanina aminotransferase e fosfatase alcalina, além de necrose hepatocelular, degeneração dos hepatócitos, hiperplasia do ducto biliar e cirrose. ^[166] Este medicamento é classificado pelo Food and Drug Administration (FDA) como um agente da categoria C, ou seja, contra indicado para pacientes que estão grávidas, por ser teratogênico em ratos e camundongos, ocasionando má formação óssea, encefalocelos e macroglossia. ^[167]

Figura 5: Mecanismo de ação e estrutura molecular do itraconazol A) Local de atuação dos azólicos; B) Molécula do itraconazol.



Fonte: Adaptado de Odds et al. 2003. ^[159]

2.4 Nanotecnologia - Nanomedicina

A nanotecnologia pode ser definida como a ciência envolvida no desenvolvimento, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos cuja menor organização funcional, em pelo menos uma das dimensões, é na escala nanométrica. ^[168]

Uma das principais áreas da nanotecnologia é denominada nanomedicina. As definições de nanomedicina continuam a ser controversas, sem uma classificação universalmente aceita. Uma das definições mais aceitas é de que a nanomedicina é a utilização de materiais em nanoescala ou nanoestruturados em medicina, modificados para terem efeitos terapêuticos baseados nas suas estruturas, com uma dimensão característica de até 300 nm. ^[169] As nanomedicinas apresentam a vantagem de dois fenômenos gerais que ocorrem na escala nanométrica: transições nas propriedades físico-químicas e transições nas interações fisiológicas. Muitas das definições iniciais de nanotecnologia empregam um ponto de corte em torno de 100 nm (incluindo a do National Nanotechnology Initiative). ^[170] No entanto, o comportamento físico-químico único, por vezes, surge para os nanomateriais com tamanho superior a 100 nm. Muitos dos benefícios das nanomedicinas estão relacionados com as interações fisiológicas únicas que surgem na transição entre as escalas molecular e microscópica. Em nível sistêmico, a biodisponibilidade do fármaco é aumentada devido à grande área superficial dos nanocarreadores e tem sido demonstrado, por exemplo, que os lipossomas com cerca de 150 nm a 200 nm de diâmetro, permanecem na corrente sanguínea mais tempo do que aquelas com diâmetros menores que 70 nm. ^[171,172] A nível de tecidos, os produtos da nanomedicina alcançam passivamente os sítios alvo pelo aumento do efeito de permeabilidade e retenção, com tamanhos tipicamente em torno de 100 nm a 200

nm. A nível celular, vias de captação e processamento de nanocarreadores dependem de muitas propriedades, mas o tamanho é um fator crítico. Macrófagos podem facilmente fagocitar esferas de poliestireno de até 200 nm. ^[173,174] Assim, embora muitos nanocarreadores empregados na terapêutica possuam tamanhos de 100 nm ou menos, este ponto de corte exclui muitas aplicações com consequências significativas para este campo. Assim, optou-se pela faixa até 300 nm para melhor abranger o comportamento fisiológico único que ocorre nessas escalas. ^[169]

Dentre os principais focos da nanomedicina em nível de pesquisa estão as doenças infecciosas, campo este que só perde para a área de produtos voltadas para o tratamento do câncer. Além disso, com relação às vias de administração, o maior número de estudos está em produtos para a via parenteral, em especial a via intravenosa. ^[169]

Um dos principais benefícios oferecidos pelas estruturas em nanoescala é a capacidade de alcançar perfis de biodistribuição únicos que não são possíveis com um “*delivery*” puramente molecular ou em microescala. Um dos fatores importantes para determinar o perfil de biodistribuição resultante é a via de administração. ^[169] Pelo fato dos nanossistemas possuírem uma grande área superficial, ocorre um aumento na solubilidade dos fármacos em meio fisiológico e consequentemente aumenta sua biodisponibilidade, melhorando o controle do tempo de liberação e oferecendo maior precisão na entrega dos fármacos em maiores extensões. Isto é particularmente interessante quando há necessidade de utilizar fármacos de alto custo ou com alta toxicidade associada. ^[175]

A condição fisiopatológica e as alterações anatômicas de tecidos doentes ou inflamados oferecem muitas vantagens para a entrega de vários sistemas

nanoestruturados. A fisiologia dos tecidos doentes é modificada por uma variedade de condições e pode ser explorada no direcionamento passivo de fármacos.^[176] Assim, são exploradas as diferenças anatômicas entre tecidos normais e doentes para conseguir a entrega direcionada e específica de fármacos. O aumento da permeabilidade vascular associada a uma drenagem linfática deficiente permite uma maior penetração e ocorre o efeito de retenção dos nanosistemas nos tecidos inflamados.^[177] Assim, esta oportunidade fisiopatológica permite o extravasamento dos nanosistemas e sua localização seletiva nos tecidos inflamados.^[178,179] Esta é uma condição presente na cromoblastomicose.^[8]

2.4.1 Nanoemulsões

Existem vários nanocarreadores utilizados na veiculação de fármacos. Dentre eles estão as nanoemulsões, também chamadas de microemulsões. Nanoemulsões são preparações farmacêuticas obtidas pela dispersão de duas fases líquidas imiscíveis ou praticamente imiscíveis com auxílio de um sistema emulsionante adequado, com tamanho de gotícula na faixa de 50 a 500 nm. Geralmente apresentam aspecto leitoso e possuem compatibilidade com o diâmetro dos vasos sanguíneos.^[24-27, 180]

Estas formulações têm sido utilizadas há mais de 40 anos como fonte de calorias e ácidos graxos em pacientes que necessitam nutrição parenteral. Além disso, por aproximadamente 30 anos, vem sendo investigado o uso de nanoemulsões para a administração parenteral de fármacos. Emulsões óleo/água são utilizadas como sistema de entrega preferencialmente quando o fármaco é solúvel na fase oleosa da emulsão. Também podem ser utilizadas no caso de fármacos com fraca solubilidade em meio aquoso e orgânico, mas que podem ser

"solubilizados" por se localizarem na camada interfacial da emulsão. Um bom exemplo é a anfotericina B. ^[30,180]

Existem, atualmente, vários métodos de fabricação de nanoemulsões descritos na literatura, dentre eles, um dos mais empregados é a homogeneização a alta pressão. Nesta técnica, uma emulsão grosseira é forçada, sob alta pressão, através de um espaço anular entre uma válvula de ajuste (móvel) e o suporte da válvula (fixo), denominado "lacuna homogeneizadora". Quando a formulação entra neste local, há um rápido aumento na velocidade e uma diminuição na pressão. A energia liberada causa turbulência e diferenças de pressão localizadas, que resultam no rompimento das gotículas. A formulação homogeneizada choca-se ao anel de impacto e sai a uma pressão suficiente para mover-se ao próximo estágio de processamento. ^[181-185]

Geralmente, os parâmetros de fabricação (pressão, temperatura e número de ciclos de homogeneização), influenciam o tamanho das gotículas obtidas por este processo. O aumento no número de ciclos leva a uma redução no tamanho de gotícula até um limite, em que a diminuição se torna irrelevante. O aumento da pressão, assim como o da temperatura, leva à diminuição no tamanho de gotícula formada, porém, uma alta pressão leva a um alto gasto de energia, havendo maior vantagem em realizar um maior número de ciclos a uma pressão moderada. ^[186]

Esta técnica possui como vantagens o fato de ser um método físico capaz à obtenção de emulsões monodispersas, mas principalmente o fato de haver grande disponibilidade de equipamentos com diferentes capacidades de produção, possibilitando o escalonamento. ^[180]

2.4.2 Formulações nanoestruturadas comerciais de anfotericina B

A anfotericina B, em sua forma de apresentação convencional, (Fungizone[®]), uma dispersão coloidal de anfotericina B com desoxicolato sódico tem seu uso clínico limitado, por causar reações adversas severas, em especial, nefrotoxicidade. Isso a tornou alvo de inúmeros estudos em nanotecnologia. [187,188]

Foram desenvolvidas e são atualmente comercializadas, três diferentes formulações lipídicas nanoestruturadas de anfotericina B. São elas: Abelcet[®], Amphocil[®]/ Amphotec[®] e Ambisome[®]. [29]

Abelcet[®] (Enzon Pharmaceuticals, Piscataway, NJ, USA) é constituída de complexos lipídicos, um conjunto de estruturas em forma de fita, formadas por uma membrana bicamada por combinação de L- α -dimiristoilfosfatidilcolina e L- α -dimiristoilfosfatidilglicerol, na proporção molar 7:3 e anfotericina B, sendo a proporção fármaco: lipídeos 1:1. [29-31]

Amphocil[®] e Amphotec[®] (Amphocil, Intermune, Inc., Burlingame, Califórnia, USA; Amphotec, Ben Venue Laboratories, Inc., Bedford, Ohio, USA) são suspensões coloidais compostas de estruturas discoidais de sulfato colestera complexado com anfotericina B, na proporção molar 1:1. [29-31]

Ambisome[®] (Fujisawa Healthcare, Inc. Deerfield, Illinois, USA) é uma formulação composta por lipossomas, que consistem em pequenas vesículas unilamelares formadas por uma membrana bicamada de fosfatidilcolina hidrogenada de soja e distearoilfosfatidilglicerol estabilizado com colesterol, combinadas com anfotericina B na proporção 2:0,8:1. [29-31]

Estas formulações têm por finalidade melhorar a tolerabilidade, pela minimização dos efeitos adversos, enquanto mantêm ou melhoram o perfil de eficácia comparadas com a anfotericina B convencional.^[32]

Os sistemas nanocarreadores das formulações comerciais diferem em tamanho, estrutura, forma, composição lipídica e conteúdo molar de anfotericina B. Apesar de todas estas diferenças, a anfotericina B em qualquer destes veículos é menos tóxica às células dos mamíferos que a forma convencional.^[31]

A complexação com lipídios parece atuar estabilizando a anfotericina B em um estado de auto-associação, não a deixando disponível para interagir com o colesterol das membranas celulares dos mamíferos, diminuindo, assim, sua toxicidade. Outra hipótese para a reduzida toxicidade das formulações lipídicas de anfotericina B é a ligação preferencial às lipoproteínas de alta densidade. Quando ligadas a estas proteínas, a liberação de anfotericina B para os rins ocorre mais lentamente ou em menor grau, sendo assim especialmente indicadas em casos de insuficiência renal pré-existente, ou ainda, quando o risco de nefrotoxicidade for elevado.^[189]

Inúmeros estudos *in vivo* e clínicos foram realizados com as formulações lipídicas para verificar sua atividade, toxicidade, farmacocinética frente à anfotericina B convencional ou até mesmo entre as diferentes formulações lipídicas.^[190,191]

Uma revisão sistemática indicou que não há diferenças significantes entre as formulações lipídicas e a anfotericina B convencional, quanto à eficácia, mas havia redução em cerca de 30% na mortalidade, quando utilizadas formulações lipídicas. Pelo fato do resultado clínico estar diretamente relacionado com a tolerabilidade, a diferença entre as formulações quanto a esse critério tem grande importância.^[192]

A principal desvantagem na utilização das formulações lipídicas de anfotericina B são seus altos custos, quando comparadas com Fungizone[®]. Esta questão é a maior limitação na clínica. [187,188]

2.4.3 Nanoemulsões de anfotericina B

A fim de diminuir a toxicidade atribuída à anfotericina B vários trabalhos testaram sua veiculação em sistemas nanoestruturados, como nanoemulsões, lipossomas, complexos de inclusão empregando ciclodextrinas e nanopartículas. [187,188,193,194] Com relação à nanoemulsões, nas últimas décadas, houve um aumento crescente de estudos relativos ao desenvolvimento desses sistemas nanoestruturados contendo anfotericina B.

Yu e colaboradores [195] desenvolveram nanoemulsões de uso intravenoso por processo de emulsificação espontânea, sendo um dos fármacos utilizados a anfotericina B. Nesta formulação foram utilizadas as matérias-primas: óleo de soja, Miglyol 812, glicerol, lecitina de soja, copolímeros de óxido de etileno e óxido de propileno, e água. Apresentou tamanho de gotícula médio de 309 nm, mostrando-se estável e adequada para administração parenteral.

Tabosa do Egito e colaboradores [196] tiveram como objetivo o desenvolvimento de uma nanoemulsão para administração parenteral composta por Miglyol 812, Lipoid E80, Synperonic F68 e água destilada, por duas técnicas de preparo distintas. As nanoemulsões apresentaram tamanho de gotícula em torno de 360 nm e em ambas as técnicas houve a produção de formulações estáveis. Esta nanoemulsão foi avaliada *in vitro* quanto à toxicidade em eritrócitos humanos e quanto à atividade antifúngica contra *Candida albicans*, sendo menos tóxica que a

formulação convencional, mas igualmente eficaz. A dose máxima tolerada da nanoemulsão foi de 2 mg/kg e de 1 mg/kg para Fungizone[®]. Além disso, em modelo murino de candidíase, a dose de 0,8 mg/kg da nanoemulsão e da formulação convencional aumentaram a sobrevida dos animais e igualmente efetivas na redução de unidades formadoras de colônia presentes no rim, quando comparadas com o controle.

Moreno e colaboradores ^[193] produziram uma nanoemulsão liofilizada de anfotericina B, composta por polissorbato 80: água (1:3), lecitina dispersa em miristato de isopropila (1:1) e anfotericina B na concentração final de 2 mg/mL. O tamanho de gotícula após reconstituição foi de aproximadamente 21nm. A toxicidade aguda foi avaliada, sendo a dose letal 50 para a nanoemulsão de 4 mg/kg, enquanto que para Fungizone[®] foi de 1mg/kg. A nanoemulsão foi considerada um bom sistema de entrega para a anfotericina B, por ser de fácil manuseio e ter um baixo custo de fabricação, estável, com características reológicas adequadas para administração parenteral e com a possibilidade de administrar maiores doses de anfotericina B, aumentando, assim sua eficácia e diminuindo o desenvolvimento de resistência pelos agentes fúngicos.

Brime e colaboradores ^[197] produziram uma nanoemulsão como alternativa à Fungizone[®]. A formulação foi desenvolvida testando-se diferentes concentrações de água, lecitina, miristato de isopropila e surfactante (Brij[®] 96V). A incorporação do fármaco foi feita por inversão de fases ou, quando a anfotericina B não era adequadamente incorporada, esta era dissolvida em 2mL de NaOH 0,1 M, misturada com a fase aquosa e lecitina e por último adicionada a fase oleosa. O tamanho médio de gotícula obtido para a formulação produzida pela primeira técnica foi de 52,5 nm e pela segunda técnica foi de 46,2 nm. Em avaliação da toxicidade

aguda *in vivo*, a dose letal 50 para a nanoemulsão foi de 2,9 mg/kg, enquanto que para Fungizone[®] foi de 1,4 mg/kg. Pela baixa toxicidade apresentada e características físico-químicas adequadas, esta formulação poderia ter aplicação terapêutica. Esta mesma formulação foi comparada com Fungizone[®] em modelo murino imunocompetente e neutropênico de candidíase sistêmica. A nanoemulsão foi bem tolerada em doses até 3 mg/kg e com poucos efeitos tóxicos. Os grupos tratados com a nanoemulsão (tanto imunocompetente quanto neutropênico) tiveram maior tempo de sobrevivência, menor mortalidade e carga fúngica.^[198] Além disso, foi avaliada a toxicidade multidosada da nanoemulsão desenvolvida, que demonstrou não causar danos histológicos nos rins ou mudanças em parâmetros bioquímicos, quando comparado com Fungizone[®].^[199]

Darole e colaboradores^[200] visavam a obtenção de uma nanoemulsão e compararam a sua toxicidade com Fungizone[®]. O produto desenvolvido foi um liofilizado de anfotericina B, com uma mistura de óleo e surfactante, para reconstituição com água, resultando na concentração de 5 mg/mL. Foi composto de monoleato de glicerila, estearato de polietilenoglicol 40 e hidroestearato de polietilenoglicol 15. O tamanho de gotícula após dispersão foi de 84 nm. *In vitro*, o percentual de hemólise da nanoemulsão foi 92% inferior à Fungizone[®]. Além disso, obteve-se *in vitro*, para a formulação, uma atividade antifúngica semelhante à Fungizone[®] e à anfotericina B dissolvida em dimetilformamida.

Filippin e colaboradores^[33] desenvolveram uma nanoemulsão para utilização parenteral, composta por triglicerídeo cáprico/caprílico, lecitina de soja e colesterol dissolvidos em clorofórmio:metanol (2:1) e anfotericina B (100mg), sendo a proporção de anfotericina B:lipídeos de 1:11. O tamanho de gotícula médio obtido foi de 137,2 nm. A concentração inibitória mínima obtida *in vitro* para a nanoemulsão

em *C. albicans* foi inferior que a de anfotericina B dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) e Fungizone[®].

Pestana e colaboradores ^[34] produziram uma nanoemulsão composta por matérias-primas biocompatíveis. São elas: fosfatidilcolina de soja: polissorbato 20 (1:1), propilenoglicol dicaprato/ dicaprilato e tampão fosfato 10 mM pH 7,2. O conteúdo de anfotericina B encapsulado foi dependente de proporção óleo/surfactante, sendo a concentração máxima obtida de 6,8 mg/mL e tamanho de gotícula na faixa de 150 nm. Apresentou alta estabilidade, sendo promissora para a administração de anfotericina B.

2.4.4 Utilização de formulações nanoestruturadas de anfotericina B no tratamento da cromoblastomicose

Quanto a utilização de formulações lipídicas de anfotericina B em cromoblastomicose, apenas dois casos clínicos foram encontrados na literatura e com resultados variáveis. Lundstrom e colaboradores ^[35] utilizaram anfotericina B lipossomal no tratamento de um paciente com neutropenia prolongada, após transplante de medula óssea autólogo. A formulação foi administrada do dia +33 ao dia +72. Entretanto paciente morreu no dia +74, por hemorragia traqueal. Verificou-se através de autópsia que o microrganismo presente na traquéia era *P. verrucosa*. Ensaio de suscetibilidade foram realizados e demonstrou-se que o microrganismo era suscetível à anfotericina B *in vitro*, mais *in vivo*, não se obteve a ação antifúngica esperada. Park e colaboradores ^[36], em caso de cromoblastomicose em área não exposta causada por *P. verrucosa*, verificaram que anfotericina lipossomal administrada juntamente com 5-fluorocitosina resultou em regressão visível das lesões e em cura micológica.

2.4.5 Formulações nanoestruturadas comerciais de itraconazol

O itraconazol vem sendo comercializado, em duas formulações nanoestruturadas: uma para utilização por via intravenosa e outra, para via oral (Sporanox[®]), nos Estados Unidos e em outros países que não o Brasil. Entretanto, a formulação intravenosa tem como contraindicação seu uso em pacientes com comprometimento renal, além de causar ataxia e esplenomegalia. A solução oral, por sua vez, tem relatada como reação adversa a diarreia. Isso é decorrente do sistema nanoestruturado utilizado, a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, à qual está associada à toxicidade e aos efeitos adversos.^[41]

A formulação intravenosa de itraconazol foi comparada com a anfotericina convencional em tratamento empírico de sepse neutropênica. A mortalidade foi semelhante, mas o itraconazol apresentou menos efeitos adversos e menor número de interrupções no tratamento devido a esses.^[201] A formulação de itraconazol intravenosa é aprovada para o tratamento de aspergilose pulmonar e extrapulmonar em pacientes intolerantes ou que apresentam infecções refratárias à anfotericina B.^[164] Entretanto, a substituição do nanocarreador atualmente utilizado por outra tecnologia se faz necessária, tanto para a diminuição dos efeitos adversos relacionados com este, quanto para solucionar o problema da biodisponibilidade reduzida do fármaco não encapsulado, que está relacionado com sua baixa solubilidade em água. Além da questão solubilidade, também é preciso avaliar a necessidade da utilização segura de altas doses do fármaco.^[40,201,202] Assim, vários estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de melhorar a eficácia, mas, sobretudo, de aumentar a segurança de formulações com este fármaco.^[39,40,202]

2.4.6 Nanoemulsões de itraconazol

Quanto a trabalhos que desenvolveram nanoemulsões de itraconazol para utilização parenteral, apenas dois trabalhos foram localizados na literatura.

Akkar e Muller ^[39] desenvolveram uma emulsão de itraconazol para uso parenteral, fazendo uso uma formulação comercial (Lipofundin[®]) e utilizando a tecnologia SolEmuls[®] para o preparo, onde o fármaco fica localizado na camada de lecitina interfacial da emulsão, por homogeneização de uma dispersão híbrida de gotículas de óleo e nanocristais de fármaco em água. Foi obtido um tamanho médio de gotículas de aproximadamente 200 nm após 15 ciclos de homogeneização. A capacidade máxima de fármaco na nanoemulsão foi de 10mg/mL. A formulação mostrou-se estável por 3 meses à temperatura ambiente.

Em estudo realizado por Rhee et al. ^[203] foi desenvolvida uma formulação parenteral aquosa contendo itraconazole, utilizando uma microemulsão O/A . Uma mistura de álcool benzílico e de triglicerídios de cadeia média (3/1) foi escolhida como a fase oleosa e a mistura de monooleato de polioxietileno (50) óleo de rícino hidrogenado e de etanol (3/1) como tensoativos. O tamanho médio das gotículas das microemulsão foi <150 nm, além desta formulação não causar hemólise em teste *in vitro*.

2.4.7 Utilização de formulações nanoestruturadas de itraconazol no tratamento da cromoblastomicose

Não foram encontrados na literatura relatos de utilização das formulações nanoestruturadas comerciais de itraconazol no tratamento da cromoblastomicose. Isso se deve, em grande parte, a disponibilidade destas formulações em apenas alguns países.

2.4.8 Propriedades biológicas das principais matérias-primas a serem utilizadas nas nanoemulsões desenvolvidas

Na elaboração das formulações foram utilizados os óleos de oliva e de peixe. O óleo de oliva apresenta o composto fenólico oleocantal, que possui atividade anti-inflamatória, atuando na inibição da cicloxigenase, enzima responsável pela biossíntese de prostaglandinas. ^[204] O óleo de peixe é rico em ômega 3 (ácidos graxos poliinsaturados), sendo que estes compostos atuam inibindo enzimas pró-inflamatórias. ^[205] Estas propriedades são interessantes no tratamento da cromoblastomicose, visto a presença de reação inflamatória crônica.

2.4.9 Toxicologia dos sistemas nanoestruturados

As nanopartículas de diversas origens vêm sendo utilizadas na terapêutica. Estas nanoestruturas podem ser subdivididas nos seguintes grupos: lipossomas, emulsões, poliméricas, cerâmicas, metais, e as de carbonos (fulerenos e nanotubos). Apesar do amplo desenvolvimento da nanotecnologia, o conhecimento sobre o efeito das nanopartículas sobre a saúde humana é praticamente ausente. ^[206] No entanto, mesmo os primeiros estudos revelaram novas propriedades gerais e biológicas para materiais conhecidos, que são adquiridas quando estas matérias-primas são transformadas em nanopartículas. Por exemplo, elas penetram nas células e são seletivamente acumuladas em vários tipos de células ou em compartimentos celulares distintos. As nanopartículas podem atravessar as células epiteliais e endoteliais por transcitose. Além disso, estes sistemas percorrem as células nervosas, os vasos sanguíneos e linfáticos provocando estresse oxidativo e inflamação. ^[207,208] Então, houve o surgimento de uma nova área de estudo dentro na nanotecnologia, a denominada nanotoxicologia, que é a ciência que examina os

efeitos de nanoestruturas artificialmente projetadas e os nanomecanismos sobre os organismos vivos. ^[208] De forma geral, os efeitos biológicos e tóxicos das nanopartículas são em função da sua forma, tamanho, origem, material, área de superfície, carga elétrica, particularidades físico-químicas da estrutura, dosagem, via de administração, concentração no órgão alvo e duração de ação. ^[209]

Há uma preocupação em estudos pré-clínicos de avaliar a toxicidade das substâncias empregadas para a produção das nanopartículas, mas não do nanossistema propriamente dito. As preparações terapêuticas e nanopartículas podem ter propriedades tóxicas diferenciadas devido a particularidades na sua cinética e biodisponibilidade *in vivo* e, possivelmente, devido à integração dos efeitos tóxicos e farmacológicos da substância química inicial e da nanopartícula propriamente dita. ^[208,209] Os estudos de toxicidade são essenciais não só para avaliar o potencial de perigo provocado pelos nanossistemas, mas também para entender como suas propriedades físico-químicas podem afetar as respostas biológicas após a administração *in vivo*. ^[210] Neste contexto, há várias respostas diferentes que os nanomateriais podem induzir quando em contato com as células, dentre eles: danos ao DNA, bem como mutações, injúrias por estresse oxidativo, apoptose, danos à membrana ou seu rompimento, ligação a proteínas, o que leva à perda de função destas últimas, inflamação e danos lisossomais. Assim, uma caracterização completa do perfil toxicológico de quaisquer nanomateriais é, portanto, crucial em estudos pré-clínicos. ^[206]

Muitos métodos têm sido utilizados na caracterização das propriedades das nanoestruturas, bem como o seu impacto toxicológico a níveis celular, tecidual e de órgãos. ^[211-214] Muitos ensaios *in vitro* que utilizam células são empregados, e incluem a avaliação da proliferação, viabilidade, necrose, apoptose, análise de

estresse oxidativo (espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico), a síntese e fragmentação do DNA, análise de ciclo celular, expressão de proteínas e ensaios de ligação, opsonização, imunoenaios, inflamação celular e verificação morfológica das culturas de células individuais ou de co-culturas. A simplificação dos modelos *in vitro* permite a seleção dos parâmetros que serão avaliados, havendo deste modo, uma maior facilidade em desvendar mecanismos causais. Por isso, os estudos *in vitro* representam uma primeira investigação o para a compreensão dos mecanismos que resultam em interações entre a célula e o nanossistema, antes de serem utilizados ensaios *in vivo*.^[206] No entanto existem algumas limitações em ensaios de viabilidade celular, onde técnicas colorimétricas de avaliação de citotoxicidade, tal como MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), apresenta interferências provocadas pelos nanocarreadores.^[215] As avaliações *in vitro* são mais econômicas e mais rápidas do que experimentos *in vivo*. Além disso, são mais vantajosas e éticas do que testes em animais. Entretanto ensaios *in vivo* também são necessários para a melhor compreensão da ação do nanossistema no organismo animal.^[206,216]

O maior foco de investigação toxicológica em relação aos nanossistemas são aqueles produzidos a base de polímeros, substâncias inorgânicas (prata, ouro, óxido de titânio, por exemplo) e de carbono (Nanotubos, fulerenos).^[206, 217-220] Devido ao fato de se pensar que a utilização de materiais biocompatíveis estaria isentando nanocarreadores de possíveis efeitos toxicológicos, pouco é avaliado com relação a este quisito em carreadores produzidos a base de lipídeos, como por exemplo, as nanoemulsões.^[47] Apesar da utilização de materiais biocompatíveis, é necessário avaliar a citotoxicidade, a genotoxicidade e a mutagenicidade dos sistemas nanoestruturados.^[217] Estes testes são recomendados pelas agências reguladoras

para novos fármacos e tem sido amplamente utilizados na triagem de fármacos que causam danos genéticos.^[221]

Dentre os testes *in vitro* utilizados para a avaliação de nanossistemas estão o ensaio clonogênico, o ensaio cometa e o teste *Salmonella*/microsossoma.^[44,46]

O ensaio clonogênico avalia a citotoxicidade de um produto. É um teste de viabilidade celular que verifica a habilidade de uma única célula crescer e formar colônia.^[222-224]

O ensaio cometa é um teste amplamente empregado para a avaliação da genotoxicidade, que é a capacidade que algumas substâncias possuem de causar danos na molécula de DNA. A presença de quebras simples, sítios lábeis alcalinos e crosslinks resultantes da ação de compostos genotóxicos, altera a estrutura do DNA das células, que normalmente está superenrolado e fortemente compactado, causando relaxamento em partes da molécula que migram em direção ao ânodo. Desta forma, após aplicação de corantes específicos, pode-se visualizar em microscópio de fluorescência a migração do DNA, que se assemelha a um cometa. A capacidade que o DNA tem de migrar é função tanto do tamanho da molécula como da quantidade de extremidades livres (quebras, por exemplo) que, mesmo ligadas a segmentos maiores, migram numa distância pequena do corpo do cometa. O tamanho da cauda inicialmente aumenta proporcionalmente à quantidade de danos, mas a migração máxima é determinada pelas condições da eletroforese, não o tamanho dos fragmentos. A intensidade da fluorescência na cauda em relação àquela do corpo do cometa fornece informações sobre a quantidade de quebras no DNA. Assim, pode-se avaliar o dano genético tanto através da medida do

comprimento da cauda do cometa, como através da quantidade de DNA presente, sendo ambos em função das doses de exposição. [225,226]

O ensaio *Salmonella*/microsoma é o mais utilizado atualmente e o único validado em larga escala por diversos laboratórios no mundo todo. O teste emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da linhagem parental LT2, auxotróficas para histidina (his-), especialmente construídas para detectar mutações do tipo deslocamento de quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA. Essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem a síntese deste aminoácido. A frequência de mutação reversa é facilmente medida pela contagem do número de colônias que crescem em meio mínimo após a exposição de uma população de células a um agente mutagênico. O teste é feito com e sem ativação metabólica. [227]

Entretanto para nanoemulsões não foram encontrados relatos da realização destes testes.

3.1 Objetivo principal

Preparar e caracterizar nanoemulsões de uso parenteral contendo anfotericina B e itraconazol, verificar sua atividade antifúngica *in vitro* frente a isolados de agentes da cromoblastomicose e avaliar sua atividade e o nível de comprometimento renal e hepático *in vivo* em modelo animal de cromoblastomicose.

3.2 Objetivos secundários

- Preparar nanoemulsões de anfotericina B e itraconazol com composição passível de administração parenteral, composta por óleos que apresentam ação anti-inflamatória, pelo método de homogeneização sob alta pressão.
- Caracterizar as nanoemulsões através de ensaios físico-químicos.
- Avaliar a atividade antifúngica apresentada pelas formulações desenvolvidas *in vitro* por metodologia padronizada e comparar com as obtidas por Abelcet[®], Fungizone[®], anfotericina B e itraconazol na forma de fármacos puros, em 60 isolados de agentes da cromoblastomicose.
- Verificar a eficácia terapêutica das formulações nanoestruturadas de anfotericina B e itraconazol desenvolvidas quando administrada por via parenteral, comparando-se com Abelcet[®], Fungizone[®], anfotericina B e itraconazol na forma de fármacos puros, em modelo animal de cromoblastomicose.
- Avaliar o nível de comprometimento renal e hepático, bem como parâmetros bioquímicos indicativos de dano renal e hepático, obtidos com as

nanoemulsões desenvolvidas comparando-se com Abelcet[®], Fungizone[®], anfotericina B e itraconazol na forma de fármacos puros, quando administradas em modelo animal de cromoblatomicose.

- Avaliar a toxicidade ocasionada pelas formulações desenvolvidas e seus respectivos fármacos livres.
- Caracterizar amostras fúngicas de *Fonsecaea* spp. e *Exophiala* spp. oriundas de casos clínicos por meio de ferramentas moleculares e quanto à sua suscetibilidade aos fármacos isoladamente e em combinação.
- Avaliar o perfil de suscetibilidade *in vitro* de 60 amostras de agentes da cromoblastomicose a cinco antifúngicos comercialmente disponíveis e avaliar o efeito da combinação de anfotericina B e terbinafina.

1. Ribeiro EL, Soares AJ, Ferreira WM et al. Cromoblastomicose: Doença presente na realidade populacional brasileira. RBAC 2006; 38 (3): 189-92.
2. Martínez RL, Tovar LJM. Chromoblastomycosis. Clin Dermatol 2007; 25:188-94.
3. Torres-Guerrero E, Isa-Isa R, Isa M et al. Chromoblastomycosis. Clin Dermatol 2012; 30: 403–08.
4. Rippon JW. Chromoblastomycosis and related dermal infections caused by dematiaceous fungi. In: Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. 2nd ed. JW Rippon, Philadelphia: WB Saunders; 1982.p. 249-76.
5. McGinnis MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. J Am Acad Dermatol 1983; 8: 1-16.
6. Padhye AA, Hampton AA, Hampton MT et al. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. Clin Infect Dis 1996; 22: 331-5.
7. Azulay RD, Azulay DR. Dermatologia. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
8. Minotto R, Bernardi CDV, Mallmann LF et al. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. J Am Acad Dermatol 2001; 44: 585-92.
9. Bonifaz A. Chromoblastomycosis. In: Arenas R, Estrada R, editors. Tropical dermatology. Georgetown, TX: Landes Bioscience; 2001.p. 68-71. (A)
10. Ameen M. Managing chromoblastomycosis. Trop Doct 2010; 40: 65-7.
11. Revankar SG, Sutton DA. Melanized fungi in human disease. Clin Microbiol Rev 2010, 23(4): 884-912.

12. Oliveira LG, Resende MA, Cisalpino EO et al. *In vitro* sensitivity to 5-fluorocytosine of strains isolated from patients under treatment for chromomycosis. *Int J Dermatol* 1975; 14(2):141-3.
13. Andrade TS, Castro LGM, Nunes RS et al. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses* 2004; 47: 216–21.
14. Daboit TC, Duquia RP, Magagnin CM et al. A case of *Exophiala spinifera* infection in Southern Brazil: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Medical Mycol Case Reports* 2012; 1: 72–5.
15. De Hoog GS, Attili-Angelis D, Vicente VA et al. Molecular ecology and pathogenic potencial of *Fonsecaea* species. *Med Mycol* 2004; 42: 405-16.
16. Najafzadeh MJ, Gueidan C, Badali H et al. Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. *Med Mycol* 2009; 47:17–25.
17. Najafzadeh MJ, Sun J, Vicente V et al. *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. *Med Mycol* 2010; 48(6): 800-6.
18. Najafzadeh MJ, Vicente VA, Sun J et al. *Fonsecaea multimorphosa* sp. nov, a new opportunistic species of *Chaetothyriales* isolated from a feline cerebral abscess. *Fungal Biol* 2011; 115: 1066-76.
19. Vicente VA, Oréllis-Ribeiro R, Najafzadeh MJ et al. Black yeast-like fungi associated with lethargic crab disease (LCD) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (*Ocypodidae*). *Vet Microbiol.* 2012; 158:109–22.
20. Lim SW, Suh MK, Kang GS et al. Molecular phylogenetics of *Fonsecaea* strains isolated from chromoblastomycosis patients in South Korea. *Mycoses* 2010; 54: 415-20.

21. Yaguchi T, Tanaka R, Nishimura K *et al.* Molecular phylogenetics of strains morphologically identified as *Fonsecaea pedrosoi* from clinical specimens. *Mycoses* 2007; 50: 255–60.
22. Capilla, J, Clemons KV, Stevens DA. Animal models: an important tool in mycology. *Med Mycol* 2007; 45 (8): 657-84.
23. Patil A, Shaikh IM, Kadam VJ, Jadhav KR. Nanotechnology in Therapeutics- Current Technologies and Applications. *Curr Nanosci* 2009; 5: 141-53.
24. Formariz TP, Scarpa MV, Correa MA *et al.* Microemulsão e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Braz J Pharm Sci* 2005; 41(03): 301-13.
25. Mendonça CRB; Bica CID; Piatnicki CMS. Water in soybean oil microemulsions as medium for electrochemical measurements. *J Braz Chem Soc* 2003; 14(4): 628-36.
26. Oliveira AG, Scarpa MV, Correa MA, Cera LFR, Formariz TP. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quim Nova* 2004; 27(1): 131-8.
27. Anton N, Benoit JP, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. *J Control Release* 2008 128, 185–99.
28. Lachman L *et. al.* Teoria e prática na indústria farmacêutica. Vol.II. Editora Fundação Calouste Gulibenkian. Lisboa 2001.p. 1517.
29. Bauters TGM, Buyle FMA, Peleman R, Robays H. Antifungal drugs and rational use of antifungals treating invasive aspergillosis: the role of the hospital pharmacist. *Pharm World Sci* 2005; 27: 31–4.

30. Hiemenz JW, Walsh TJ. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. *Clin Infect Dis* 1996; 22(2): 33-44.
31. Kohno K, Tomono K., Maesaki S. Drug delivery systems for infection: liposome-incorporating antimicrobial drugs. *J Infect Chemother* 1998; 4: 159-73.
32. Girois SB, Chapuis F, Decullier E, Revol BGP. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol* 2006; 25:138–49.
33. Filippin FB, Souza LC, Maranhão RC. Amphotericin B associated with triglyceride-rich nanoemulsion: stability studies and *in vitro* antifungal activity. *Química Nova* 2008; 31(3): 591-4.
34. Pestana KC, Formariz TP, Franzini CM et al. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. *Colloid Surface B* 2008; 66: 253–9.
35. Lundstrom TS, Fairfax MR, Dugan et al. *Phialophora verrucosa* infection in a BMT patient. *Bone Marrow Transpl* 1997; 20: 789-91.
36. Park SG, Oh SH, Suh SB et al. A case of chromoblastomycosis with an unusual clinical manifestation caused by *Phialophora verrucosa* on an unexposed area: treatment with a combination of amphotericin B and 5-flucytosine. *Brit J Dermatol* 2005; 152: 560-4.
37. Andriole VT. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *J Antimicrob Chemoth* 1999; 44: 151-2.
38. Bonifaz A, Carrasco-Gerard E, Saul A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* 2001; 44:1-7.(b)
39. Akkar A, Muller HR. Intravenous itraconazole emulsions produced by SolEmuls technology. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 56: 29-36.

40. Vaughn JM, McConville JT, Burgess DS et al. Single dose and multiple dose studies of itraconazole nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 63: 95–102.
41. Mouton JW, Van Peer A, De Beule K et al. Pharmacokinetics of Itraconazole and Hydroxyitraconazole in Healthy Subjects after Single and Multiple Doses of a Novel Formulation. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(12): 4096–102.
42. Donaldson K, Stone V, Tran CL et al. 2004. Nanotoxicology. *Occup Environ Med* 2004; 61: 727–8.
43. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 2008; 4: 26–49.
44. Woodruff RS, Li Y, Yan J et al. Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the Ames test and Comet assay. *J Appl Toxicol* 2012; 32(11): 934-43.
45. Arora S, Rajwade JM, Paknikar KM. Nanotoxicology and *in vitro* studies: The need of the hour. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 258: 151-65.
46. Chattopadhyay N, Cai Z, Kwon YL et al. Molecularly targeted gold nanoparticles enhance the radiation response of breast cancer cells and tumor xenografts to X-radiation. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 137(1):81-91.
47. Souto EB, Martins-Lopes P, Lopes CM et al. A Note on Regulatory Concerns and Toxicity Assessment in Lipid-Based Delivery Systems (LDS). *J Biomed Nanotechnol* 2009; 5: 317-22.
48. Pedroso A, Gomes JM. Sobre 4 casos de dermatite verrucosa produzida pela *Phialophora verrucosa*. *An Paul Med Cir* 1920; 11: 53-61.
49. Castro RM, Castro LG. On the priority of description of chromomycosis. *Mykosen* 1987; 30: 397- 403.

50. Rudolph M. Über die brasilianische 'Figueira' (Vorläufige Mitteilung). Archiv f. Schiffs u. Tropen Hyg 1914; 18: 498- 9.
51. Terra F, Torres M, Fonseca Filho O, Arêa Leão AE. Novo tipo de dermatite verrucosa: micose por *Acrotheca* com associação de leishmaniose. Brasil Med 1922; 36: 363-8.
52. Odds FC, Arai T, Disalvo AF, Evans EG et al. Nomenclature of fungal diseases: a report and recommendations from a Sub-Committee of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM). J Med Vet Mycol 1992; 30: 1-10.
53. Rivitti EA, Aoki V. Deep fungal infections in tropical countries. Clin Dermatol 1999; 17: 171-90.
54. Lupi O, Tying SK, McGinnis, MR. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. J Am Acad Dermatol 2005; 53: 931–5.
55. Queiroz-Telles F, Esterre P, Perez-Blanco M et al. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. Med Mycol 2009; 47(1): 3-15.
56. Queiroz-Telles F, McGinnis MR, Salkin I, Graybill JR. Subcutaneous mycoses. Infect Dis Clin North Am 2003; 17: 59-85.
57. Yegres F. Cromomicosis por *Cladosporium carrionii* em criadores de caprinos del Estado Falcon. Rev Invest Clin 1985; 26: 235-46.
58. Velasquez LF, Restrepo A, Calle G. Chromomycosis: experiencia de doce anos. Acta Med Colomb 1976; 1: 165-71.
59. Macola S, Rodriguez DP, Font E et al. Cromomicosis: hongos dematiaceos que intervienen en su etiologia. Rev Cubana Med 1984; 36(3): 136-41.

60. Burstein Z. Cromomicosis: clinica y tratamiento; situación epidemiológica em Latinoamérica. Rev Perú Med Exp Salud Publica 2004; 21(3): 167-75.
61. Jayalakshmi P, Looi LM, Soo-Hoo TS. Chromoblastomycosis in Malaysia. Mycopathologia 1990; 109: 27-31.
62. Rajendran C, Ramesh, Misra RS et al. Chromoblastomycosis in India. Int J Dermatol 1997; 36: 29-33.
63. Attapatu MC. Chromoblastomycosis-A clinical and Mycological study of 71 cases from Sri Lanka. Mycopathologia 1997; 137:145-51.
64. Fukushiro R. Chromomycosis in Japan. Int J Dermatol 1983; 22: 221-9.
65. Kondo M, Hiruma M, Nishioka Y et al. A case of chromomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* and a review of reported cases of dematiaceous fungal infection in Japan. Mycoses 2005; 48(3): 221-6.
66. Malkina AY, Darchenkova NN. Distribution of chromoblastomycosis in the world. Vestn Dermatol Vener 1977; 1: 41-5.
67. Le Gall F, Lulin J, Coutatarmanach A et al. Une parasitose cutanée rarement observée en France: la chromomycose. Ann Pathol 1993; 13: 123-7.
68. Esterre P, Andriantsimahavandy A, Ramarcel ER, Pecarrere JL. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. Am J Trop Med Hyg 1996; 55: 45-7.
69. Bayles MAH. Chromomycosis. Curr Top Med Mycol 1995; 6: 221.
70. Leslie DF, Beardmore GL. Chromoblastomycosis in Queensland: a retrospective study of 13 cases at the royal brisbane hospital. Aust J Dermatol 1979; 20: 23-30.

71. Matte SMW, Lopes JO, Melo IS et al. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul : Relato de 12 casos. Rev Soc Bras Med Trop 1997; 30(4): 309 -11.
72. Correia RTM, Valente NYS, Criado PR, Martins JEC. Chromoblastomycosis: study of 27 cases and review of medical literature. An Bras Dermatol 2010; 85(4): 448-54.
73. Mouchalouat MF, Galhardo MCG, Zancopé-Oliveira MR et al. Chromoblastomycosis: a clinical and molecular study of 18 cases in Rio de Janeiro, Brazil. Int J Dermatol 2011; 50: 981–6.
74. Pires CAA, Xavier MB, Quaresma JAS, Macedo GMM, Sousa BRM, Cardoso de Brito, A. Clinical, epidemiological and mycological report on 65 patients from the Eastern Amazon region with chromoblastomycosis. An Bras Dermatol 2012; 87(4): 555-60.
75. Bopp C, Bernardi CDV. Geopatologia da cromoblastomicose no Rio Grande do Sul. Med Cutan 1973; 7:1-8.
76. Londero AT, Ramos CD. Cromoblastomicose no interior do Rio Grande do Sul. An Bras Dermatol 1989; 64: 155-8.
77. Hernandez-Hernandez F, Camacho-Arroyo I, Cerbon MA et al. Sex hormone effects on *Phialophora verrucosa in vitro* and characterization of progesterone receptors. J Med Vet Mycol 1995; 33: 235-9.
78. Tsuneto LT, Arce-Gomez B, Petzl-Erler ML, Queiroz-Telles F. HLA-A29 and genetic susceptibility to chromoblastomycosis. J Med Vet Mycol 1989; 27: 181-5.
79. Cardoso de Brito A. Chromoblastomycosis. In: Tyring S, Lupi O, Hengge U, editors. Tropical dermatology. New York: Churchill Livingstone; 2006. p. 203-5.

80. Arenas R. Chromoblastomycosis. New York: Marcel Dekker; 1990. p. 43-51.
81. Surash S, Tyagi A, de Hoog GS et al. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea monophora*. Med Mycol 2005; 43:465-72.
82. Najafzadeh MJ, Rezusta A, Cameo MI et al. Successful treatment of chromoblastomycosis of 36 years duration caused by *Fonsecaea monophora*. Med Mycol 2010; 48(2): 390-3.
83. Najafzadeh MJ, Sun J, Vicente VA et al. Molecular epidemiology of *Fonsecaea* species. Emerg Infect Dis 2011; 17 (3): 464-9.
84. Daboit TC, Magagnin CM, Heidrich D et al. A case of relapsed chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora*: antifungal susceptibility and phylogenetic analysis. No prelo. Mycopathologia 2013.
85. Salgado CG, Silva, JP, Diniz JAP et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. Rev Inst Med Trop S Paulo 2004; 46 (1): 33-6.
86. Silva CM, Rocha RM, Moreno JS et al. The coconut babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) as a probable risk of human infection by the agent of chromoblastomycosis in the State of Maranhão, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 1995; 28 (1): 49-52.
87. Vicente VA, Angellis D A, Queiróz-Telles Filho F et al. Isolation of *Herpotrichiellaceae* fungi from the environment. Braz J Microbiol 2001; 32 (1): 47-51.
88. Queiroz-Telles F, Purim KS, Fillus JN et al. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. Int J Dermatol 1992; 31(11): 805-12.

89. Zeppenfeldt G, Richard-Yegres N, Yegres F. *Cladosporium carrionii*: hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomicosis en Venezuela. Rev Iberoamer Micol 1994; 11: 61-3.
90. Bonifaz A, Vázquez-González D, Perusquía-Ortiz AM. Subcutaneous mycoses: chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma. JDDG 2010; 8: 619-28.
91. Walter P, Garin Y, Richard-Lenoble D. Chromoblastomycosis, a morphological of the host- parasite interaction. Virchows Arch 1982; 397: 203-14.
92. Da Silva MB, Da Silva JP, Yamano SSP et al. Development of natural culture media for rapid induction of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells *in vitro*. J Clin Microbiol 2008; 46(11): 3839–41.
93. Schnitzler N, Peltroche-Llacsahuanga H, Bestier N et al. Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. Infect Immunol 1999; 67: 94-101.
94. Rozental S, Alviano CS, De Souza W. The *in vitro* susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. Mycopathologia 1994; 126: 85-91.
95. Alviano CS, Farbiarz SR, De Souza W. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. J Gen Microbiol 1999: 137:837-44.
96. Rosen T, Overholt M. Persistent viability of the Medlar body. Int J Dermatol 1996; 14: 479–83.

97. Perez-Blanco M, Hernández Valles R, Garcia-Humbria L, Yegres F. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcon State, Venezuela. *Med Mycol* 2006; 44: 467-71.
98. Pardo-Castelo V, Leon R, Trespalacios F. Chromoblastomycosis in Cuba. *Arch Dermatol Syph* 1942; 65: 19-32.
99. Carrion AL. Chromoblastomycosis. *Ann N Y Acad Sci* 1950; 50:1255-82.
100. Lavalle P. Chromomycosis. In Canizare O, editor. *Clinical Tropical Dermatology*. London: Blackwell Scientific Publications; 1975.p. 36-41.
101. Restrepo A, Gonzalez A, Gomez I et al. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 544: 504-16.
102. Ameen M. Chromoblastomycosis: clinical presentation and management. *Clin Exp Dermatol* 2009; 34: 849-54.
103. Zaitz C, Ruiz LRB, Souza VM. *Atlas de Micologia Médica: Diagnóstico Laboratorial*. 2ª Ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora. 2004. p. 167.
104. Najafzadeh MJ, Sun J, Vicente VA, De Hoog GS. Rapid identification of fungal pathogens by rolling circle amplification using *Fonsecaea* as a model. *Mycoses* 2011; 5: e577-82.
105. Garcia-Marques S, Pedroso e Silva CM, Resende MA et al. Detection of delayed hypersensitivity to *Fonsecaea pedrosoi* metabolic antigen (chromomycin). *Jpn J Med Mycol* 2008; 49: 95-101.
106. Oberto-Perdigón L, Romero H, Pérez-Blanco M, Apitz-Castro R. An ELISA test for the study of the therapeutic evolution of chromoblastomycosis by *Cladophialophora carrionii* in the endemic area of Falcon State, Venezuela. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22: 39-43.

107. Esterre P, Queiroz-Telles F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Curr Opin Infect Dis* 2006;19(2):148-52.
108. Bonifaz A, Paredes-Solis V, Saul A. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. *Expert Opin Pharmacol* 2004; 5: 247-54.
109. Lopes CF, Alvarenga RJ, Cisalpeno EO et al. Six years experience in treatment of chromomycosis with 5-flucytosine. *Int J Dermatol* 1978; 17: 414.
110. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, Castañón-Olivares LR. *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. 2a. edición, ed. México Trillas; 2004.
111. Bayles Ma. Tropical mycoses. *Chemotherapy* 1992; 38 (1): 27-34.
112. Diaz M, Negroni R, Monteiro-Gei F et al. A Pan-American 5-year study of fluconazole therapy for deep mycosis in the immunocompetent host. *Clin Infect Dis* 1992; 14: S568.
113. Fader RC, McGinnis MR. Infections caused by dematiaceous fungi: chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis. *Infect Dis Clin North Am* 1988; 2: 925.
114. Negroni R, Tobon A, Bustamante B et al. Posaconazole treatment of refractory eumycetoma and chromoblastomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2005; 47: 339–46.
115. Gupta AK, Taborda PR, Sanzovo AD. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Med Mycol* 2002; 40: 529–34.
116. Kuper KM, Coyle EA, Wanger A . Antifungal Susceptibility Testing: A Primer for Clinicians. *Pharmacotherapy* 2012; 32(12) 1112-22.

117. Caligiorne RB, Resende MA, Melillo PHC et al. *In vitro* susceptibility of chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis agents to antifungal drugs. *Med Mycol* 1999; 37: 405-9.
118. Bedout C, Gómez BL, Restrepo A. *In vitro* susceptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. *Rev I Med trop* 1997; 39 (3): 145-8.
119. Fothergill AW, Rinaldi MG, Sutton DA. Antifungal susceptibility testing of *Exophiala* spp.: a head-to-head comparison of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *Med Mycol* 2009; 47: 41- 3.
120. Vitale RG, Perez-Blanco M, De Hoog GS. *In vitro* activity of antifungal drugs against *Cladophialophora* species associated with human Chromoblastomycosis. *Med Mycol* 2009; 47: 35-40.
121. Najafzadeh MJ, Badali H, Illnait-Zaragozi MT et al. *In Vitro* Activities of eight antifungal drugs against 55 clinical isolates of *Fonsecaea* spp. *Antimicrob Agents Ch* 2010; 54 (4): 1636-8.
122. Daboit TC, Magagnin CM, Heidrich D et al. *In vitro* susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and the combination of terbinafine and amphotericin B. No prelo. *Mycoses*, 2013.
123. Yu J, Li R, Zhang M, Liu L, Wan Z. *In vitro* interactions of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblastomycosis in China. *Med Mycol* 2008; 46: 745-7.
124. Zhang J, Xi L, Zhang H et al. Synergistic effects of terbinafine and itraconazole on clinical isolates of *Fonsecaea monophora*. *Eur J Dermatol* 2009; 19 (5): 451-5.
125. Biancalana FSC, Lyra L, Moretti ML, Schreiber AZ. Susceptibility testing of terbinafine alone and in combination with amphotericin B, itraconazole, or

- voriconazole against conidia and hyphae of dematiaceous molds. *Diagn Microb Infect Dis* 2011; 71: 378–85.
126. Revankar SG. Dematiaceous fungi. *Mycoses* 2007; 50: 91-101.
127. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. 1st ed. Wayne, PA: *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*; 2002 Approved Standard M38-A.
128. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2008 Approved Standard M38-A2.
129. Cardona-Castro N, Agudelo-Florez P, Restrepo-Molina R. Chromoblastomycosis murine model and *in vitro* test to evaluate the sensitivity of *Fonsecaea pedrosoi* to ketoconazole, itraconazole and saperconazole. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91(6): 779-84.
130. Borelli D. A method for producing chromomycosis in mice. *T Roy Soc Trop Med H* 1972; 66(5): 793-94.
131. Polak A. Experimental infection of mice by *Fonsecaea pedrosoi* and *Wangiella dermatitidis*. *Sabouraudia*. 1984; 22 (2):167-9.
132. Polak A. Antimycotic therapy of experimental infections caused by dematiaceous fungi. *Sabouraudia*. 1984; 22 (4): 279-89.
133. Cardona-Castro N, Agudelo-Flórez P. Development of a chronic chromoblastomycosis model in immunocompetent mice. *Med Mycol* 1999; 37: 81–3.

134. Bocca AL, Brito PMS, Figueiredo F et al. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia* 2006; 161(4): 195-203.
135. Machado AP, Freymuller E, Fischman O. Experimental murine chromoblastomycosis obtained from *Fonsecaea pedrosoi* isolate cultured for a long period. *J Venom Anim Toxins* 2009; 15(4): 680-95.
136. Machado AP, Regis Silva MR, Fischman O. Prolonged infection by *Fonsecaea pedrosoi* after antigenic co-stimulation at different sites in experimental murine chromoblastomycosis. *Virulence* 2010; 1(1): 29-36.
137. Xie Z, Zhang J, Xi L et al. A chronic chromoblastomycosis model by *Fonsecaea monophora* in Wistar rat. *Med Mycol* 2010; 48(1): 201-20.
138. Calvo E, Javier Pastor F, Mayayo E et al . Antifungal therapy in an athymic murine model of chromoblastomycosis by *Fonsecaea pedrosoi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55 (8): 3709-13.
139. Calvo E, Javier Pastor F, Salas V et al. Histopathology and antifungal treatment of experimental murine chromoblastomycosis caused by *Cladophialophora carrionii*. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67 (3): 666-70.
140. Perusquía-Ortiz AM, Vázquez-González D, Bonifaz A. Opportunistic filamentous mycoses: aspergillosis, mucormycosis, phaeohyphomycosis and hyalohyphomycosis. *JDDG* 2012; 10: 611–21.
141. Revankar SG, Patterson JE, Sutton DA et al. Disseminated Phaeohyphomycosis: Review of an Emerging Mycosis. *Clin Infect Dis* 2002; 34 (4): 467-76.

142. Matsumoto T, Ajello L, Matsuda T et al. Developments in hyalohyphomycosis and phaeohyphomycosis. *J Med Vet Mycol* 1994; 32(1): 329-49.
143. Brandt ME, Warnock DW. Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. *J Chemother* 2003; 15: 36 – 47.
144. Sudduth EJ, Crumbley AJ, III, Farrar WE. Phaeohyphomycosis due to *Exophiala* species: clinical spectrum of disease in humans. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 639 – 44.
145. Silveira F, Nucci M. Emergence of black moulds in fungal disease: epidemiology and therapy. *Curr Opin Infect Dis* 2001; 14: 679– 84.
146. Queiroz-Telles F, Nucci M, Lopes Colombo A, Tobón A, Restrepo A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol* 2011; 49: 225–36.
147. Clancy CJ, Wingard JR, Hong Nguyen M. Subcutaneous phaeohyphomycosis in transplant recipients: review of the literature and demonstration of *in vitro* synergy between antifungal agents. *Med Mycol* 2000; 38: 169 – 75.
148. Lacaz CS, Porto E, Andrade JG, Queiroz Telles, F. Feohifomicose disseminada por *Exophiala spinifera*. *An Bras Dermatol* 1984; 59: 238-43.
149. Badali H, Chander J, Bayat M et al. Multiple subcutaneous cysts due to *Exophiala spinifera* in an immunocompetent patient. *Med Mycol* 2012; 50: 207– 13.
150. Singh G, Shivaprakash M R, De D et al. Chronic Disfiguring Facial Lesions in an Immunocompetent Patient Due to *Exophiala spinifera*: A Case Report and Review of Literature. *Mycopathologia* 2012; 174(4): 293-9.

151. Wang, L.; She, X.; Lv, G.; et al. Cutaneous and mucosal phaeohyphomycosis caused by *Exophiala spinifera* in a pregnant patient: Case report and literature review. *Mycoses* 2012; 55 (4): 266.
152. Lin YP, Li W, Yang, YP et al. Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala spinifera* in a patient with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2012; 21(5): 548-51.
153. Campos-Takaki GM, Lobo Jardim M. Report of chronic subcutaneous abscesses caused by *Exophiala spinifera*. *Mycopathologia*. 1994; 127: 73-6.
154. Harris JE, Sutton DA, Rubin A et al. *Exophiala spinifera* as a cause of cutaneous phaeohyphomycosis: case study and review of the literature. *Med Mycol* 2009; 47: 87 – 93.
155. Lemke A, Kiderlen AF, Kayser O. Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 68: 151-62.
156. Falci DR, Dos Santos RP, Wirth F, Goldani LZ. Continuous infusion of amphotericin B deoxycholate: an innovative, low-cost strategy in antifungal treatment *Mycoses* 2009; 54, 91-8.
157. Brajtbur J, Powderly WG, Kobayashi G, Medorff G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 183-8.
158. Kleinberg M. What is current and future status of conventional amphotericin B? *Int J Antimicrob* 2006; 27: 12-6.
159. Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 2003; 11(6): 272-9.

160. Rocha MFG, Sidrim JJC. Drogas antifúngicas. In: Sidrim JJC, Moreira JLB. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 36-44.
161. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(1): 40–79.
162. Wu JJ, Pang KR, Huang DB, Tying SK. Therapy of systemic fungal infections. *Dermatol Ther* 2004; 17: 532–8.
163. Barone JA, Moskovitz BL, Guarnieri J et al. Enhanced bioavailability of itraconazole in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin solution versus capsules in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Ch* 1998; 42:1862–5.
164. Slain D, Rogers PD, Cleary JD, Champman SW. Intravenous itraconazole. *Ann Pharmacother* 2001; 35:720–9.
165. Enoch DA, Ludlam HA, Brown N. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol* 2006; 55: 809–18.
166. Somchit N, Norshahida AR, Hasiah AH et al. Hepatotoxicity induced by antifungal drugs itraconazole and fluconazole in rats: a comparative in vivo study. *Hum Exp Toxicol* 2004; 23(11): 519 – 25.
167. Bradbury BD, Jick SS. Itraconazole and Fluconazole and certain rare, serious adverse events. *Pharmacotherapy* 2002; 22(6): 697-700.
168. Emerich DF, Thanos CG. Nanotechnology and medicine. *Expert Opin Biol Th* 2003; 3: 655–63.
169. Etheridge ML, Campbell AS, Erdman Arthur G. et al. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomed-Nanotechnol* 2013; 9 (1): 1-14.

170. NNI .What is nanotechnology. National Nanotechnology Initiative 2010. Available from: <http://www.nano.gov/html/facts/whatIsNano.html>. Accessed February 10, 2011.
171. Van Eerdenbrugh B, Van den Mooter G, Augustijns P. Top-down production of drug nanocrystals: nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. *Int J Pharma* 2008; 364 (1): 64-75.
172. Litzinger DC, Buiting AMJ, van Rooijen N, Huang L. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta (BBA) -. Biomembranes* 1994; 1190 (1): 99-107.
173. Chou LY, Ming K, Chan WC. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem Soc Rev* 2010; 40:233-45.
174. Clift MJD, Rothen-Rutishauser B, Brown DM, Duffin R et al. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 232(3):418-27.
175. Khosravi-Darani K; Pardakhty A; Honarpisheh H et al. The role of high-resolution imaging in the evaluation of nanosystems for bioactive encapsulation and targeted nanotherapy. *Micron* 2007; 38: 804–818.
176. Vasir JK, Reddy MK, Labhasetwar V. Nanosystems in drug targeting: opportunities and challenges. *Curr Nanosci* 2005; 1: 47–64.
177. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Rel* 2000; 65: 271–84.
178. Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 2004; 303: 1818–22.

179. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine* 2007; 3(1): 20–31.
180. Almeida ME, Teixeira HF, Koester LS. Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na atualidade. *Lat Am J Pharm* 2008; 27 (5): 780-8.
181. Jahnke DIS. The theory of high-pressure homogenization. In: Müller RH, Benita S, Böhn B, eds. *Emulsions and Nanosuspensions for Formulation of Poorly Soluble Drugs*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers; 1998. p. 177-200.
182. Sznitowska M, Janicki S, Dabrowska EA, Gajewska M. *Eur J Pharm Sci* 2002; 15: 489-95.
183. Flourey J, Legrand J, Desrumaux A. Analysis of a new type of high pressure homogenizer. A study of the flow pattern. *Chem Eng Sci* 2004; 59: 843-53.
184. Flourey J, Legrand J, Desrumaux A. Analysis of a new type of high pressure homogenizer. Part B. Study of droplet breakup and re-coalescence. *Chem Eng Sci* 2004; 59: 1285-94.
185. Lu Y, Wang YJ, Tang W. Formulation and thermal sterile stability of a less painful intravenous clarithromycin emulsion containing vitamin E. *Int J Pharm* 2008; 346: 47-56.
186. Bock, T. Manufacture of emulsions by means of high-pressure homogenization parameters, oils and surfactants. In: Müller RH, Benita S, Böhn B, eds. *Emulsions and Nanosuspensions for Formulation of Poorly Soluble Drugs*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers; 1998. p. 201-36.

187. Fukui H, Koike T, Saheki A et al. Evaluation of the efficacy and toxicity of amphotericin B incorporated in lipid nano-sphere (LNS[®]). *Int J Pharm* 2003; 263: 51–60.
188. Fukui H, Koike T, Nakagawa T et al. Comparison of LNS-AmB, a novel low-dose formulation of amphotericin B with lipid nano-sphere (LNS[®]), with commercial lipid-based formulations. *Int J Pharm* 2003; 267: 101-12.
189. Steinbach, JW, Stevens DA. Review of Newer Antifungal and Immunomodulatory Strategies for Invasive Aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2003; 37(3): 157–87.
190. White MH, Bowden RA, Sandler ES et al. Randomized, double-blind clinical trial of amphotericin B colloidal dispersion vs. amphotericin B in the empirical treatment of fever and neutropenia. *Clin Infect Dis* 1998; 27:296-302.
191. Ruijgrok EJ, Vulto AG, van Etten EWM. Aerosol delivery of amphotericin B desoxycholate (Fungizone) and liposomal amphotericin B (AmBisome): aerosol characteristics and *in-vivo* amphotericin B deposition in rats. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52: 619-27.
192. Barrett JP, Vardulaki KA, Conlon C et al. A systematic review of the antifungal effectiveness and tolerability of amphotericin B formulations. *Clin Ther* 2003; 25:1295-320.
193. Moreno MA, Frutos P, Ballesteros P. Lyophilized lecithin based oil-water microemulsions as a new and low toxic delivery system for amphotericin B. *Pharm Res* 2001; 18(3): 344-51.
194. Tiyboonchai W, Limpeanchob N. Formulation and characterization of amphotericin B–chitosan–dextran sulfate nanoparticles. *Int J Pharm* 2007; 329:142-9.

195. Yu W, Tabosa do Egito ES, Barratt G et al.. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by a spontaneous emulsification process. *Int J Pharm* 1993; 89: 139-46.
196. Tabosa do Egito ES, Fessi H, Appel M et al. New techniques for preparing submicronic emulsion: application to amphotericin B. *STP Pharma Sci* 1994; 4(2): 155-62.
197. Brime B, Moreno MA, Frutos G et al. Amphotericin B in oil-water lecithin-based microemulsions: formulation and toxicity evaluation. *J Pharm Sci* 2002; 91(4):1178–85.
198. Brime B, Molero G, Frutos P et al. Comparative therapeutic efficacy of a novel lyophilized amphotericin B lecithin-based oil-water microemulsion and deoxycholate amphotericin B in immunocompetent and neutropenic mice infected with *Candida albicans*. *Eur J Pharm Sci* 2004; 22: 451–58.
199. Brime B, Frutos P, Bringas P et al. Comparative pharmacokinetics and safety of a novel lyophilized amphotericin B lecithin-based oil-water microemulsion and deoxycholate amphotericin B in animal models. *J Antimicrob Chemoth* 2003; 52: 103–9.
200. Darole PS, Hegde DD, Nair HA. Formulation and evaluation of microemulsion based delivery system for amphotericin B. *AAPS Pharm Sci Tech* 2008; 9(1): 122-8.
201. Boogaerts M, Winston DJ, Bow EJ et al. Intravenous and oral itraconazole versus intravenous amphotericin B deoxycholate as empirical antifungal therapy for persistent fever in neutropenic patients with cancer who are receiving broad-spectrum antibacterial therapy. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2001; 135: 412–22.

202. Rabinow B, Kipp J, Papadopoulos P et al. Itraconazole IV nanosuspension enhances efficacy through altered pharmacokinetics in the rat. *Int J Pharm* 2007; 339: 251–60.
203. Rhee YS, Park CW, Nam TY et al. Formulation of parenteral microemulsion containing itraconazole. *Arch Pharm Res* 2007; 30 (1): 114-23.
204. Cicerale S, Breslin PA, Beauchamp GK, Keast RS. Sensory characterization of the irritant properties of oleocanthal, a natural anti-inflammatory agent in extra virgin olive oils. *Chem Senses* 2009; 34(4): 333-9.
205. Massaro M, Scoditti E, Carliccio MA, De Caterina R. Basic mechanisms behind the effects of n-3 fatty acids on cardiovascular disease. *Prostag Leukotr Ess* 2008; 79:109-15.
206. Bimbo LM, Peltonen L, Hirvonen L, Santos HA. Toxicological Profile of Therapeutic Nanodelivery Systems. *Curr Drug Metab* 2012; 13: 1068-86.
207. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect* 2005; 113 (7): 823-39.
208. Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A et al. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol* 2007; 150(5): 552-8.
209. Durnev AD. Toxicology of Nanoparticles. *B Exp Biol Med* 2008; 145 (1): 72-4.
210. Jiang J, Oberdorster G, Biswas P. Characterization of size, surface charge and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanopart Res* 2008; 11:77–89.

211. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006; 311(5761): 622-7.
212. Marquis BJ, Love SA, Braun KL, Haynes CL. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst* 2009; 134(3): 425-39.
213. Fadeel B, Garcia-Bennett AE. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62(3): 362-74.
214. Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Zhang LW. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 234(2): 222-35.
215. Laaksonen T, Santos H, Vihola H et al. Failure of MTT as a toxicity testing agent for mesoporous silicon microparticles. *Chem Res Toxicol* 2007; 20(12): 1913-18.
216. Kunzmann A, Andersson B, Thurnherr T et al. Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1810(3): 361-73.
217. Amaral AC, Bocca AL, Ribeiro AM et al. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. *J Antimicrob Chemoth* 2009; 63: 526–33.
218. Wise JP, Goodale BC, Wise SS et al. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. *Aquat Toxicol* 2010; 97: 34–41.
219. Shinohara N, Matsumoto K, Endoh S et al. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity tests on fullerene C60 nanoparticles. *Toxicol Lett* 2009; 191: 289-96.

220. Ghosh M, Bandyopadhyay M, Mukherjee A. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. *Chemosphere* 2010; 81(10):1253-62.
221. Snyder RD, Green JW. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutat Res* 2001; 488: 151–169.
222. Bezerra DP, Moura DJ, Rosa RM et al. Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkaloid of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. *Mutat. Res* 2008; 652: 164–74.
223. Franken NA, Rodermond HM, Stap J et al. Clonogenic Assay of cells *in vitro*. *Nat Protoc* 2006; 1(5): 2315-9.
224. Machado S, Villela IV, Moura DJ et al. 3,3-Ditriethylselenodiphenyl diselenide: A new organoselenium compound with interesting antigenotoxic and antimutagenic activities. *Mutat Res* 2009; 673(2):133-40.
225. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184-91.
226. Fairbarin DW, Olive PL, O'Neill KLO. The comet assay comprehensive review. *Mutat Res* 1995; 339: 37-59.
227. Ames BN, Mc Cann J, Yanasaki E, Choi E. Detection of carcinogens and mutagens in *Salmonella*/microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31: 347-64.

Capítulo I: Nanoemulsão de anfotericina B: avaliação da atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* em agentes da cromoblastomicose (Artigo Formatado de Acordo com as Normas da Revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy)

Nanoemulsão de anfotericina B: avaliação da atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo*
em agentes da cromoblastomicose

Tatiane Caroline Daboit^{1,2#}, Miriana da Silva Machado³, Cibele Massotti Magagnin^{1,2},
Daiane Heidrich^{1,2}, Suelen Vigolo², Lúcia Collares Meirelles², Sílvia Stanisçuaski
Guterres⁵, João Antônio Pegas Henriques^{3,4}, Maria Isabel Edelweiss¹, Maria Lúcia
Scroferneker^{1,2#}

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

² Departamento de Microbiologia, Immunologia and Parasitologia, ICBS,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

³ Genotox – Royal, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Brasil.

⁴ Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.

⁵ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Título curto: Nanotecnologia e agentes da cromoblastomicose

Palavras-chave: anfotericina B, nanoemulsão, *Fonsecaea pedrosoi*, agentes da cromoblastomicose, Abelcet[®], Fungizone[®], atividade antifúngica *in vitro*, suscetibilidade *in vivo*, nanotoxicologia.

Autores correspondentes. Endereço: Rua Sarmiento Leite, 500,

Sala 210, Porto Alegre, CEP: 90050-170, Brasil.

Tel.: +55 51 3308 3934. Fax: +55 51 3308 3121

e-mail: tatidaboit@gmail.com / scrofern@ufrgs.br

Resumo

Uma nanoemulsão de anfotericina B passível de administração parenteral foi satisfatoriamente produzida pelo método de homogeneização à alta pressão. Esta nanoemulsão foi avaliada quanto a sua atividade antifúngica por método *in vitro* e *in vivo* em agentes da cromoblastomicose. Pelo método *in vitro* não foi possível determinar a atividade antifúngica tanto da nanoemulsão de anfotericina B quanto de Abelcet[®]. Já no ensaio *in vivo*, a nanoemulsão apresentou atividade superior à anfotericina B livre e Fungizone[®], além de reduzir significativamente o número de colônias quando comparada ao controle. Na dosagem dos níveis séricos de uréia foi observado um aumento significativo nestes níveis quando administrada anfotericina B livre e Fungizone, enquanto os níveis obtidos com a nanoemulsão de anfotericina B e Abelcet foram semelhantes ao controle, sugerindo uma proteção renal conferida com estes últimos tratamentos. Na análise histopatológica foi possível verificar que a nanoemulsão reduz a nefrotoxicidade causada pela anfotericina B, quando comparada com Fungizone[®] e o fármaco livre. Há uma tendência de que a nanoemulsão de anfotericina B e Abelcet[®] causem um percentual de hemólise inferior à anfotericina B livre e Fungizone[®]. A anfotericina B livre foi citotóxica para células V79 em concentrações a partir de 4µg/mL e apresentou IC50 de 2,65 µg/mL, enquanto que com a nanoemulsão não foi observada toxicidade na mesma faixa de concentração aplicada à anfotericina B livre e não foi possível determinar o IC 50. A nanoemulsão de anfotericina B produzida poderia ser, no futuro, uma alternativa de tratamento para a cromoblastomicose.

Introdução

A cromoblastomicose é uma micose cutânea e subcutânea, crônica, progressiva, causada pela implantação transcutânea de diversos gêneros de fungos dematiáceos (1-3). Esta doença é associada a baixas taxas de cura e grande número de recidivas, particularmente em casos crônicos com lesões de grande extensão (4, 5).

Assim como outras micoses endêmicas, estudos clínicos comparativos não estão disponíveis, muito em função da natureza esporádica da doença. Deste modo, não há tratamentos de escolha para esta micose, mas uma série de opções terapêuticas, eleitas com base em casos clínicos. Os tratamentos atualmente empregados são dividido em três grupos: tratamentos físicos, quimioterápicos e a combinação dos dois primeiros grupos (6). Com relação aos fármacos antifúngicos, ainda hoje poucas opções estão disponíveis. A terapia com estes agentes consiste de longos períodos com doses elevadas. Dentre os antifúngicos utilizados no tratamento desta doença estão o itraconazol, a terbinafina e a anfotericina B. Todos estes agentes estão associados a efeitos adversos significativos e requerem monitoramento apropriado das funções hepática e renal (7, 8). Neste sentido, o desenvolvimento de novos fármacos ou formulações que melhorem o tratamento desta micose é fundamental.

A anfotericina B é considerada o padrão ouro da terapia antifúngica, apesar do desenvolvimento de novos fármacos (9, 10). Não é considerada uma terapia de primeira linha na cromoblastomicose devido à sua significativa nefrotoxicidade, o que não permite a sua utilização a longo prazo. Além disso, alguns fungos dematiáceos apresentam resistência a este antifúngico (6, 8). Assim, o

desenvolvimento de formulações que melhorem a atividade do fármaco e reduzam os efeitos adversos são extremamente importantes para a terapêutica.

Recentes descobertas no campo da nanotecnologia têm aumentado drasticamente a pesquisa em sistemas de entrega de fármacos (11). Nanoemulsões são dispersões termodinamicamente estáveis, formadas por duas fases líquidas, nas quais uma geralmente consiste de uma solução aquosa contendo uma mistura de tensoativos e eletrólitos e a outra, uma fase orgânica. São sistemas amplamente empregados na veiculação de fármacos, em especial para a via parenteral (12-16).

A nanotoxicologia, uma vertente da nanotecnologia, tem por função abordar especificamente os efeitos adversos para a saúde que possam ser causados por nanomateriais, a fim de resolver as lacunas do conhecimento nesta área (17). Apesar da utilização de materiais biocompatíveis na produção de nanocarreadores de fármacos, é imprescindível avaliar sua toxicidade (18). Além disso, pelo fato da anfotericina B possuir toxicidade intrínseca (19) é necessário avaliar se esta toxicidade é reduzida quando este fármaco está incorporado em um nanossistema.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a suscetibilidade de agentes da cromoblastomicose à nanoemulsão de anfotericina B por nós produzida por metodologias *in vitro* e *in vivo*, comparando com uma formulação nanoestruturada comercial (Abelcet[®]), com a formulação convencional (Fungizone[®]) e com o fármaco livre. Além disso, foram avaliados parâmetros toxicológicos da nanoemulsão quando comparada ao fármaco livre.

Materiais e Métodos

Fármacos e produtos químicos

As preparações farmacêuticas de anfotericina B foram obtidas de Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, EUA (Fungizone[®]) e de Enzon Pharmaceuticals, Piscataway, NJ, EUA (Abelcet[®]). Anfotericina B, Pluronic[®] F-68, meio RPMI 1640, MOPS foram adquiridos de Sigma (St Louis, MO, EUA). Lipoid[®] S-40, óleo de oliva e óleo de peixe purificados foram adquiridos Lipoid[®] GmbH (Ludwigshafen, RP, Alemanha), glicerina e DMSO de Synth[®] (Diadema, SP, Brasil); vitamina E pó da Galena Química e Farmacêutica (Campinas, SP, Brasil). Ágar batata e ágar Sabouraud foram de BD Difco[™] (Franklin Lakes, NJ, EUA). Todos os outros solventes e reagentes utilizados no estudo eram da mais alta qualidade disponível comercialmente.

Preparação da nanoemulsão de anfotericina B

Na elaboração da nanoemulsão foram utilizadas matérias-primas aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) para administração parenteral, em concentrações também aprovadas por este órgão. A composição da nanoemulsão foi baseada em fórmulas empregadas em nutrição parenteral, com matérias-primas que tivessem alguma atividade intrínseca que pudesse contribuir com o tratamento da cromoblastomicose.

Inicialmente foram preparadas duas fases distintas, uma fase orgânica composta por: óleo de peixe (2,0%), óleo de oliva (8,0%), Lipoid[®] S-40 (1,0%) e vitamin E pó (0,05%), que foi levada a banho-maria com agitação a fim de solubilizar os componentes até a temperatura de 40°C. Após esta fase foi arrefecida à temperatura ambiente, adicionada a anfotericina B (0.5 mg/mL) e mantida sob

agitação. A fase aquosa, composta por Pluronic[®] F-68 (1,0%), glicerina (2,5%) e água Milli Q[®] em quantidade suficiente para 100 mL, também foi aquecida até a temperatura de 40°C para a solubilização dos componentes.

Para formação da pré-emulsão, as fases foram misturadas e homogeneizadas com auxílio do Ultra-Turrax (T25, Ika), a 16000 rpm por 5 min. Após, a emulsão grosseira obtida foi homogeneizada a alta pressão com refrigeração (Panda 2K NS1001L, Niro Soavi) aplicando-se 3, 6 e 9 ciclos de 500 bar. Foi preparada a mesma nanoemulsão sem a presença de fármaco (nanoemulsão branca) para fins de comparação. As preparações foram armazenadas a 4°C.

Caracterização da Nanoemulsão

A nanoemulsão produzida foi caracterizada segundo tamanho de gotícula e polidispersão, potencial zeta, pH, viscosidade, taxa de associação, concentração de fármaco e quanto à presença de possíveis fenômenos de instabilidade.

A determinação do diâmetro e da polidispersão da nanoemulsão foi realizada pela técnica de difração de laser (Mastersizer 2000, Malvern), microscopia eletrônica de transmissão (Jeol, JEM 1200 ExII) e confirmada através de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer[®] nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern).

O pH foi mensurado em potenciômetro (B474 Micronal) diretamente na nanoemulsão.

O potencial zeta da nanoemulsão foi obtido através de eletroforese (Zetasizer[®] nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern), após diluição da mesma (500 vezes, v/v) em solução de NaCl 10 mM previamente filtrada através de membrana 0,45 µm.

A viscosidade da nanoemulsão foi determinada com auxílio de viscosímetro rotacional Brookfield, modelo LVDV-II+ Pro com spindle ULA. Para as determinações, a amostra foi acondicionada no dispositivo acoplado a banho de água termostatizado circulante a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O conteúdo declarado de anfotericina B foi verificado na formulação testada. Para isso, a dispersão coloidal foi tratada com metanol a fim de extrair o ativo da nanoemulsão. Após a extração, uma alíquota da amostra foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Perkin Elmer Series 200, UV/Vis, $\lambda = 360\text{ nm}$) para determinação quantitativa do ativo. A fase móvel utilizada era composta de acetonitrila, metanol e EDTA 0,0025M, na proporção de 40:45:15. O método analítico foi devidamente validado.

A concentração de ativo associado aos colóides foi avaliada considerando-se a diferença entre a concentração total de anfotericina B na formulação e a concentração de anfotericina na forma livre presente na fase aquosa da dispersão. A determinação do ativo livre foi realizada através de ultrafiltração-centrifugação da dispersão (membrana de nylon - porosidade $0,45\text{ }\mu\text{m}$) quantificando-se a anfotericina B livre no ultrafiltrado por CLAE.

Possíveis fenômenos de instabilidade da nanoemulsão de anfotericina B foram avaliados através de retroespalhamento de luz (Turbiscan Lab[®]). As análises foram conduzidas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1h com *scans* a cada 5 minutos.

A estabilidade da nanoemulsão foi analisada ao longo do tempo, através do doseamento da nanoemulsão e avaliação do tamanho de gotícula.

Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

Para avaliação da suscetibilidade dos agentes da cromoblastomicose à nanoemulsão de anfotericina B produzida foi utilizado o documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (20). Os isolados foram cultivados em agar batata (BD, Franklin Lakes, USA) por 7 dias a 35°C e os inóculos foram preparados por adição de solução salina 0,85% sobre as colônias fúngicas, as quais foram levemente raspadas com auxílio de uma pipeta estéril. Após, deixou-se em repouso durante 3 a 5 minutos, em temperatura ambiente, para a deposição das partículas de maiores dimensões, e a concentração de esporos no sobrenadante foi ajustada espectrofotometricamente (530 nm). Para os fungos *Fonsecaea spp.* (n=44), *P. verrocosa* (n=6), *C. carrionii* (n=6) e *R. aquaspersa* (n=2), os inóculos foram padronizados na faixa de transmitância de 68-70%, enquanto que para *E. spinifera* (n=2) foi utilizada a faixa de transmitância de 80-82%, que correspondem a uma concentração final na placa de 1.5×10^4 to 4×10^4 UFC/mL. A viabilidade dos inóculos foi confirmada por plaqueamento e contagem do número de colônias. Para fins de comparação, foram avaliadas as atividades antifúngicas de Abelcet[®], Fungizone[®], anfotericina B solubilizada em DMSO e nanoemulsão branca. A faixa de concentração avaliada para a nanoemulsão de anfotericina B e Abelcet[®] foi de 0,5 - 256 µg/mL, enquanto que para Fungizone[®] e anfotericina B solubilizada em DMSO, a faixa de concentração avaliada foi de 0,03 - 16 µg/mL. A nanoemulsão branca foi avaliada em volume idêntico ao volume utilizado de nanoemulsão de anfotericina B. As placas foram incubadas a 35°C por até 120 h. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram determinadas visualmente por comparação com crescimento nos poços contendo o fármaco com o controle sem tratamento e o controle de esterilidade, e foi definida como a menor concentração de fármaco que impediu

qualquer crescimento visível, isto é, que produziu 100% de inibição. *Candida krusei* ATCC 6258 foi utilizada como controle de qualidade e incluída em cada ensaio realizado.

Determinação da atividade antifúngica *in vivo*

A amostra *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428 foi cultivada em ágar batata por 10 dias a 26 °C para induzir a formação de conídios. Com solução salina 0,85% estéril foi preparada uma suspensão de esporos e hifas a partir da cultura, a qual foi quantificada em hemocitômetro e ajustada em 10^7 UFC/mL. Após, esta suspensão de esporos foi inoculada em três pontos da região dorsal, pela via subcutânea, em camundongo BALB/c. O camundongo foi mantido por 21 dias e após eutanasiado. A amostra de fungo coletada do animal foi semeada em agar Sabouraud- dextrose acrescido de cloranfenicol e procedeu-se da mesma forma que foi descrito anteriormente para outros três animais. Este procedimento foi realizado a fim de melhorar a virulência da amostra fúngica. Após este processo, esta cepa foi cultivada novamente em agar batata por 10 dias a 26°C e desta foi produzida uma suspensão de esporos a qual foi semeada em placas de agar sangue e crescidas a 26 °C por 10 dias. A partir destas culturas foi produzida uma suspensão de esporos contendo 10^6 UFC/mL, a qual foi inoculada em camundongos Balb/c machos com 6 a 8 semanas, pesando em média 29 g, intraperitonealmente (100 µL) e em cada uma das patas traseiras do animal (50 µL). A diluição da suspensão original foi cultivada em placas de Agar batata para testar a viabilidade. Após 15 dias da inoculação foi iniciado o tratamento dos animais, até o 30º dia. Os animais foram divididos randomicamente em sete grupos contendo nove animais em cada. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em fotoperíodo de 12 horas de claro / 12 horas

de escuro, temperatura controlada de 24 °C, alimentados com ração padrão para roedores e água *ad libitum*. Foram realizadas administrações diárias, sendo quatro administrações intralesionais, realizadas mediante anestesia dos animais com isoflurano, intercaladas com administrações intraperitoniais e no restante dos dias foram feitas apenas aplicações intraperitoneais. A dose de anfotericina B (anfotericina B livre, Fungizone[®], nanoemulsão de anfotericina B e Abelcet[®]) foi de 1mg/kg/dia, dose esta, compatível com as utilizadas em humanos. No 31º dia, após anestesia com isoflurano, foi retirado o sangue destes animais pela via intracardíaca, para realização de exames bioquímicos (creatinina pelo método Jaffé sem desproteinização, alanina aminotransferase pelo método UV cinético e uréia pelo método enzimático UV), e após os animais foram eutanaziados em câmara de CO₂. Foram separadas as patas, sendo que uma foi inoculada, após maceração, em agar Sabouraud-dextrose acrescido de cloranfenicol e incubada a 26 °C por 10 dias e com a outra foi realizada uma análise histopatológica. A eficácia dos diferentes tratamentos foi avaliada pela contagem do nº de colônias obtidas em relação aos controles sem tratamento. Os rins e o fígado dos animais também foram avaliados histopatologicamente. Para os estudos histopatológicos, as peças foram fixadas com formalina tamponada 10%. As amostras foram devidamente tratadas e cortadas. Por fim foram realizadas as colorações hematoxilina e eosina (H&E) para todos os órgãos avaliados e coloração Grocott exclusivamente para as patas. Todas as lâminas foram examinadas por microscopia óptica. Foram incluídos como controle, animais infectados sem tratamento, animais que receberam água glicosada (utilizada para a diluição das medicações) e animais que receberam a nanoemulsão branca. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e do Hospital de Clínicas de Porto

Alegre (HCPA). Os ensaios foram supervisionados pela equipe técnica da Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do HCPA

Ensaio de hemólise

Foram isolados eritrócitos de sangue fresco de um voluntário sadio não identificado. As hemácias foram lavadas três vezes com tampão fosfato (PBS, pH 7,4) e, em seguida, suspensas em PBS com 5% de hematócrito. Os tratamentos foram adicionados à suspensão de eritrócitos e diluídos com PBS para resultar em concentrações finais de anfotericina B de 6,25-50 µg/mL. As hemácias foram incubadas por 1 h a 37 °C em uma incubadora com agitação. A hemólise foi interrompida por imersão dos tubos de amostra em banho de água gelada. As hemácias não lisadas foram removidas por centrifugação a 3000 rpm por 5 min. e a concentração de hemoglobina, que foi liberada das células lisadas no sobrenadante foi determinada pela medição da sua absorvância a 540 nm. O percentual de hemólise foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{Hemólise} = 100 \times (A_{b_s} - A_{b_0}) / (A_{b_{100}} - A_{b_0})$$

onde A_{b_s} é absorvância da amostra tratada com cada um dos diferentes tratamentos, $A_{b_{100}}$ absorvância de 100% das amostras lisadas tratadas com água destilada/deionizada, A_{b_0} é a absorvância da amostra não lisada tratada com PBS, pH 7,4.

Avaliação da Citotoxicidade e Mutagenicidade

A nanoemulsão de anfotericina B produzida foi avaliada quanto a seu potencial citotóxico e mutagênico, quando comparado com o fármaco livre.

Células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês) foram mantidas em cultura contínua em garrafas de 25 cm². O cultivo foi realizado em meio DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina (0,2 mg/mL L-glutamina, incluído no protocolo de formação de colônia). A incubação foi a 37⁰C sob atmosfera úmida (90%) com 5% de CO₂/ar. Para desgrudar as células dos frascos de cultura foi utilizado tratamento com 0,15% de tripsina e 0,08% de EDTA em PBS.

Em seguida, a linhagem V79 foi incubada em placas para cultura de células com seis poços na concentração de 200 células por poço, sendo três poços por grupo de tratamento. As células foram crescidas em 2 mL de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, high glucose - Gibco), suplementado com soro bovino fetal e antibióticos por 24 ± 1 horas a 37 ± 1 °C e 5% de CO₂. No experimento Clonogênico – Escolha de Doses, as células foram incubadas em meio de cultura por 24 ± 1 horas a 37 ± 1 °C e 5 % de CO₂ com o controle negativo ou com a substância teste (anfotericina B livre ou nanoemulsão de anfotericina B). No experimento Clonogênico – Citotoxicidade, as células também foram tratadas por 24 ± 1 horas a 37 ± 1°C e 5 % de CO₂ com o controle negativo (DMSO 0,5%), substância teste e com o controle positivo (DMSO nas concentrações de 0,5, 1, 2, 4 e 8 %). Após os tratamentos, o meio de cultura foi aspirado, as células foram lavadas com PBS e reincubadas com meio de cultura a 37 ± 1 °C e 5 % de CO₂. Após sete dias do início do ensaio, o meio de cultura foi aspirado, as células foram fixadas e coradas com uma solução de cristal violeta 0,1 % e as colônias visíveis foram contadas.

O Teste *Salmonella*/microsoma foi realizado com diferentes concentrações da amostra, utilizando as linhagens TA98, TA100, TA97a, TA1535 e TA102 na presença e ausência de fração pós-mitochondrial de fígado - S9 (Moltox™). As linhagens serão incubadas por 20-30 minutos com a amostra na presença e ausência de ativação metabólica, sendo posteriormente homogeneizadas com ágar de superfície e espalhado em placas de meio mínimo para incubação por 48-72 horas a 37°C. Foram usadas placas em triplicata, incluindo os controles negativo e positivo. Após o período de incubação, o número de colônias revertentes será contado. O teste *Salmonella*/microsoma – Escolha de doses foi realizado da mesma forma, mas utilizado apenas a linhagem TA 100.

Análises estatísticas

Na caracterização da nanoemulsão são empregados os valores de média e desvio-padrão referentes a três lotes distintos.

Na determinação da concentração inibitória mínima, avaliação quantitativa das colônias obtidas do macerado das patas e no ensaio de hemólise foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com teste Post-Hoc de Dunn. Quando $p < 0,05$, as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes.

Com relação aos dados de ensaios com células V79 foram expressos em média e desvio padrão e analisados estatisticamente por ANOVA de uma via com teste de Tukey de comparações múltiplas, utilizando o software GraphPad Prism 4,00. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Dados de mutagenicidade em bactérias foram analisados usando o software Salmonel. Um composto foi considerado positivo para mutagenicidade apenas

quando: (a) o número de revertentes foi de pelo menos o dobro do rendimento espontâneo ($IM \geq 2$ - índice mutagênico: número de colônias induzidas na amostra / número de colônias espontâneas no controle negativo), (b) uma resposta significativa foi determinada por análise de variância ($p \leq 0,05$), e (c) quando houve uma dose-resposta positiva reprodutível ($P \leq 0,01$).

Resultados

Preparação e caracterização da nanoemulsão de anfotericina B

Em relação ao preparo foram avaliados os efeitos dos ciclos realizados no homogeneizador à alta pressão na redução do tamanho de gotícula e polidispersão. Verificou-se através da técnica de espalhamento de luz dinâmico que a formulação com 3, 6 ou 9 ciclos (Figura 1) apresentou população exclusivamente nanométrica, entretanto de 3 para 6 ciclos houve uma diminuição no tamanho de gotícula médio (de 182 nm para 166 nm) e na polidispersão (1,782 para 1,612), enquanto que entre 6 e 9 ciclos não houve alteração em nenhum dos parâmetros avaliados. Determinou-se, então, que a formulação empregada nos experimentos seria produzida com 6 ciclos de 500 bar. Assim, o tamanho de gotícula foi de 166 ± 5 e polidispersão de $1,612 \pm 0,01$.

Quanto à caracterização físico-química, foi avaliado o potencial zeta, o qual foi de $-23,6 \pm 1,02$ mV, valor este considerado adequado para manter o sistema sem agregação e precipitação das nanoestruturas, devido à repulsão eletrostática que as mesmas apresentam, resultante da carga de superfície.

O pH $6,5 \pm 0,1$ é condizente com as matérias-primas e método de preparo empregado. O teor experimental obtido foi próximo ao valor teórico ($0,575 \pm 0,05$ mg/mL e 0,5 mg/mL respectivamente). Com relação à taxa de associação, esta foi

de 80,87%. Quanto ao perfil reológico da nanoemulsão produzida, este se apresentou como newtoniano ($2 \pm 0,1$ cP), onde a viscosidade é constante com o aumento da taxa de cisalhamento e os valores de tensão e taxa de cisalhamento apresentam-se diretamente proporcionais.

Uma nanoemulsão branca, sem anfotericina B, foi igualmente preparada e caracterizada. O diâmetro médio obtido foi de 171 ± 3 nm e polidispersão $1,637 \pm 0,01$, o potencial zeta $-22,7 \pm 1,07$ mV , pH foi de $6,22 \pm 0,1$ e viscosidade ($2 \pm 0,1$ cP). Estes resultados indicam que a presença da anfotericina B na nanoemulsão não modifica as características físico-químicas analisadas.

Foi realizada a análise de retroespalhamento de luz dinâmico. O princípio desta técnica baseia-se na variação da fração volumétrica da gotícula, resultando na variação transmissão e do backscattering. Pode-se determinar através desta técnica fenômenos de migração de gotícula como cremagem e sedimentação e fenômenos de alteração no diâmetro como floculação e coalescência. Além disso, é possível verificar os fenômenos de instabilidade muito antes que o analista possa detectá-lo visualmente. Avaliando a figura 2 pode-se verificar um aumento na variação do backscattering na base da cubeta e diminuição do backscattering no topo desta, que indicam a migração de partículas do topo para a base da cubeta, sugerindo um possível fenômeno de sedimentação de nanocristais do fármaco.

Realizou-se uma avaliação da formulação por microscopia eletrônica de transmissão. As imagens obtidas são condizentes com os dados de tamanho de partícula e polidispersão obtidos por outras técnicas (Figura 3).

Avaliou-se também a estabilidade das formulações produzidas. As nanoemulsões (anfotericina B e branca) são estáveis por 45 dias conservadas em

geladeira. Há o surgimento de uma população micrométrica após 60 dias de estocagem em geladeira, mas não ocorrendo redução no teor de fármaco.

Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

De acordo com a tabela 1 verificou-se que não foi possível determinar a concentração inibitória mínima para a nanoemulsão de anfotericina B e Abelcet[®] em agentes da cromoblastomicose pela metodologia *in vitro*. A nanoemulsão branca não apresentou atividade inibitória. A anfotericina B solubilizada em deoxicolato de sódio (Fungizone[®]) possui uma tendência de maior atividade antifúngica que o fármaco livre solubilizado em DMSO.

Determinação da atividade antifúngica *in vivo*

A nanoemulsão de anfotericina B produzida apresentou atividade antifúngica superior ao fármaco livre, Fungizone[®] e até mesmo à Abelcet[®], dados estes que estão contidos na tabela 2. A redução no n^o de colônias foi estatisticamente significativa nos animais foram tratados com a nanoemulsão de anfotericina B, quando comparados ao grupo controle, ao grupo tratado com água glicosada e ao grupo que recebeu a nanoemulsão branca ($p < 0,01$).

Através dos exames bioquímicos pudemos verificar que não houve alteração nos níveis de creatinina (0,3 mg/dL) para todos os diferentes grupos e os níveis de uréia foram mais elevados nos animais que receberam anfotericina B Livre e Fungizone[®] (tabela 3), sendo que ambos os grupos diferem significativamente dos grupos que receberam água glicosada, nanoemulsão branca e o grupo controle ($p < 0,01$). Os níveis foram semelhantes entre a nanoemulsão de anfotericina B e Abelcet[®], os quais não diferiram significativamente do controle, sugerindo que houve uma

proteção renal com estes tratamentos. Os níveis de alanina aminotransferase não foram diferentes do grupo controle, para todos os grupos avaliados.

Com relação às análises histopatológicas, pudemos verificar nas patas de animais eutanaziados após 15 dias da inoculação (data do início dos tratamentos) que há a presença majoritária de esporos nos tecidos, próximo à camada córnea, com raras hifas, sendo que as estruturas fúngicas não se transformaram em células escleróticas. Há presença de reação granulomatosa e certo grau de fibrose (Figura 4).

Na análise dos cortes histológicos de rins (Figura 5), pudemos verificar que os veículos (água glicosada (b) e Nanoemulsão Branca(c)) não causaram danos renais. Anfotericina B Livre (d) e Fungizone[®] (e) causaram graves danos aos rins, sendo que no primeiro tratamento pode-se visualizar necrose tubular aguda grau 3 no túbulo proximal e no segundo tratamento, necrose tubular aguda grau 2 tanto no túbulo proximal quanto no coletor. Já nos animais tratados com Abelcet[®] (f), é possível verificar necrose focal no primeiro segmento do túbulo proximal e necrose tubular aguda grau 2 no túbulo coletor e nos tratados com a nanoemulsão de anfotericina B (g), também verificou-se que há a presença de necrose focal no túbulo proximal, mas com menor intensidade, quando comparada com Abelcet[®] e mantém a necrose tubular aguda grau 2 no túbulo coletor. Com estes dados podemos afirmar que a nanoemulsão de anfotericina B protegeu os rins quando comparada ao fármaco livre e Fungizone[®] e a proteção foi superior à de Abelcet[®].

Já na análise dos fígados dos animais tratados verificou-se que a água glicosada, veículo utilizado para diluir as medicações (indicada para a anfotericina B, pois solução salina é incompatível), causou danos hepáticos e conseqüentemente em todos os tratamentos há a presença de certo grau de processo degenerativo

citoplasmático. Para o fármaco livre, Fungizone[®] e a nanoemulsão de anfotericina B foi possível visualizar danos superiores aos causados pela água glicosada. Já com a Abelcet[®] foi possível verificar um menor processo de microvacuolização quando comparada com a água glicosada e não houve presença de danos quando administrada a nanoemulsão branca.

Ensaio de hemólise

Os resultados do ensaio de hemólise estão contidos na figura 6. Há uma tendência de redução no percentual de hemólise nos grupos tratados com a nanoemulsão de anfotericina B e com Abelcet[®], quando comparados com os grupos tratados com Fungizone[®] e anfotericina B Livre.

Avaliação da Citotoxicidade e Mutagenicidade

No experimento Clonogênico – Escolha de Doses, a linhagem foi incubada com o controle negativo ou com a anfotericina B nas concentrações de 0,0208, 0,208, 2,08, 20,8, 208 µg/mL. A substância teste induziu 100 % de citotoxicidade nas duas maiores concentrações utilizadas. Além disso, pela aplicação da regressão não linear o valor de 2,484 µg/mL foi estimado como IC50.

Com base nos resultados do experimento Clonogênico – Escolha de Doses, o experimento Clonogênico– Citotoxicidade foi realizado com a anfotericina B nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 µg/mL. A anfotericina B foi considerada citotóxica nas concentrações a partir de 4 µg/mL para fibroblastos de pulmão de hamster chinês – células V79. Além disso, a substância teste apresentou o valor de 2,65 µg/mL como valor de IC50, ou seja, a concentração mínima que induz morte celular em 50 % da população tratada.

No experimento Clonogênico – Escolha de Doses, a linhagem foi incubada com o controle negativo ou com a nanoemulsão de anfotericina B nas concentrações de 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1 e 10 µg/mL. Não foi possível determinar o IC50. Baseados neste resultados, o experimento Clonogênico– Citotoxicidade foi realizado com a nanoemulsão de anfotericina B nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 µg/mL, mesma concentração utilizada para o fármaco livre. A nanoemulsão não se mostrou citotóxica nestas concentrações, também não sendo possível determinar o IC50.

Nos experimentos realizados para a anfotericina B e com a nanoemulsão, também foi utilizado o controle positivo DMSO nas concentrações de 0,5, 1, 2, 4 e 8%, sendo que este composto apresentou o valor de IC50 de 2,093% e 2,912% respectivamente (estimado pela regressão não linear). Estes valores são similares aos dados do histórico do laboratório, o que confirma a validade dos experimentos.

O teste *Salmonella*/microsoma- Escolha de Doses foi realizado com a linhagem TA100, em ausência e em presença de metabolização, nas mesmas condições descritas para o teste *Salmonella*/microsoma - Mutagenicidade. As concentrações utilizadas de anfotericina B foram de 0,67, 3,33, 16,66, 83,32 e 416,6 µg/placa em presença e ausência de metabolização, sendo a dose máxima testada determinada conforme o limite da solubilidade da substância teste. Nenhuma das concentrações testadas mostrou toxicidade. Assim, as concentrações escolhidas para o teste *Salmonella*/microsoma – Mutagenicidade foram de 82,3, 166,6, 250,0, 333,3 e 416,6 µg/placa em ausência e em presença de metabolização. A substância teste não apresentou toxicidade em nenhuma das linhagens e concentrações testadas no teste *Salmonella*/microsoma – Mutagenicidade. A anfotericina B apresentou resultados negativos para mutagenicidade, não sendo capaz de induzir

mutação reversa nas linhagens de *S. typhimurium* TA100, TA98, TA97a, TA102 e TA1535, quando testadas da concentração de 0,67 µg/placa até a concentração de 416,6 µg/placa em ausência e em presença de fração metabolizante de fígado de rato de S9.

O Teste *Salmonella*/microsossoma- Escolha de Doses foi realizado com a linhagem TA100, em ausência e em presença de metabolização, nas mesmas condições descritas para o teste *Salmonella*/microsossoma- Mutagenicidade. As concentrações utilizadas de nanoemulsão de anfotericina B foram de 0,008, 0,04, 0,2, 1 e 5 µL/placa em presença e ausência de metabolização, sendo a dose máxima testada determinada conforme a concentração máxima recomendada para testes com substâncias líquidas. Nenhuma das concentrações testadas mostrou toxicidade. Assim, as concentrações escolhidas para o teste *Salmonella*/microsossoma – Mutagenicidade foram de 1, 2, 3, 4 e 5 µL/placa em ausência e em presença de metabolização. Estes 5µL equivalem a 2,375 µg de anfotericina B. A substância teste não apresentou toxicidade em nenhuma das linhagens e concentrações testadas no teste *Salmonella*/microsossoma - Mutagenicidade .

Discussão

No presente trabalho foram avaliados os efeitos de uma nanoemulsão de anfotericina B, visando aumentar a atividade antifúngica deste fármaco frente a agentes da cromoblastomicose, bem como reduzir os efeitos adversos causados pela anfotericina B.

A anfotericina B, por apresentar mecanismo fungicida, possui maior espectro que os demais antifúngicos clinicamente disponíveis (9, 10). A nefrotoxicidade é o efeito adverso associado mais comum, fato que limita a utilização de doses maiores,

além de afetar pelo menos 30% dos indivíduos tratados e ser responsável por uma alta taxa de mortalidade (21-23). Diminuir esta toxicidade foi o alvo de muitos estudos baseados na nanotecnologia (24, 25). É relatado na literatura que as formulações nanoestruturadas comerciais de anfotericina B apresentam maior a tolerabilidade, pela minimização dos efeitos adversos, enquanto mantêm ou melhoram o perfil de eficácia quando comparadas com a anfotericina B convencional (26). Entretanto, estas formulações foram utilizadas em apenas dois casos de cromoblastomicose na literatura, um com resultado positivo e o outro negativo (27, 28). Assim, não sabemos qual é o papel destas formulações no tratamento da cromoblastomicose.

Nanoemulsões são preparações farmacêuticas obtidas pela dispersão de duas fases líquidas imiscíveis ou praticamente imiscíveis com auxílio de um sistema emulsionante adequado, com tamanho de gotícula na faixa de 50 a 200 nm podendo ir até 500 nm. Geralmente apresentam aspecto leitoso e possuem compatibilidade com o diâmetro dos vasos sanguíneos (12, 29). Por aproximadamente 30 anos, vem sendo investigado o uso de nanoemulsões para a administração parenteral de fármacos. Emulsões óleo/água são utilizadas como sistema de entrega preferencialmente quando o fármaco é solúvel na fase oleosa da emulsão. Também podem ser utilizadas no caso de fármacos com fraca solubilidade em meio aquoso e orgânico, mas que podem ser "solubilizados" por se localizarem na camada interfacial da emulsão. Um bom exemplo é a anfotericina B (29, 30). Uma das metodologias empregadas para a produção de nanoemulsões é a homogeneização à alta pressão. Esta técnica possui como vantagens o fato de ser um método físico capaz de obter emulsões monodispersas, mas principalmente o fato de haver grande disponibilidade de equipamentos com diferentes capacidades

de produção, possibilitando o escalonamento, o que pode resultar em formulações com menor valor agregado quando comparadas às formulações nanoestruturadas disponíveis comercialmente, onde são empregadas outras técnicas de produção (29). Geralmente, os parâmetros de fabricação (pressão, temperatura e número de ciclos de homogeneização, influenciam o tamanho das gotículas obtidas por este processo. O aumento no número de ciclos leva a uma redução no tamanho de gotícula até um limite, em que a diminuição se torna irrelevante (31). Isso pode ser observado em nosso estudo onde o aumento de 3 ciclos para 6 ciclos proporcionou uma diminuição, entretanto de 6 para 9 ciclos, não houve alteração no tamanho de gotícula. O aumento da pressão, assim como o da temperatura, leva à diminuição no tamanho de gotícula formada, porém, uma alta pressão e uma alta temperatura levam a um alto gasto de energia, havendo maior vantagem em realizar um maior número de ciclos a uma pressão e temperatura moderadas (31). Entretanto, como em nosso caso não haveria a possibilidade de realizar um aumento na temperatura, visto que a anfotericina B é um fármaco termolábil, o que acarretaria na degradação do fármaco. A nanoemulsão produzida por esta técnica apresentou características satisfatórias para uma nanoemulsão para utilização parenteral. A produção de nanoemulsões de anfotericina B são relatadas na literatura (32-34), mas nenhuma foi produzida por esta técnica e nenhuma foi testada contra agentes da cromoblastomicose.

Alguns estudos realizaram a avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de nanoemulsões de anfotericina B (32, 33, 35). Tabosa do Egito et al. (1994) verificou atividade similar entre a nanoemulsão produzida e a formulação convencional (32). Darole et al. (2008) encontrou os mesmos resultados, sendo que além da nanoemulsão ter atividade igual a formulação convencional, apresentou também a

mesma atividade que anfotericina B solubilizada em dimetilformamida (35). Já Fillipin et al. (2008) verificou que a nanoemulsão possuía atividade antifúngica superior que a formulação convencional e à anfotericina B solubilizada em DMSO (33). No entanto, cada estudo utilizou uma metodologia distinta, por isso a discrepância entre os resultados. Além disso, utilizaram apenas um isolado para teste, sempre do gênero *Candida*. Estes resultados podem não ser reproduzidos quando se tem um número maior de isolados em teste. Além disso, o que explica o fato destes estudos obterem resultados tão divergentes dos por nós obtidos, é a composição da parede celular da levedura, que pode ser mais permeável às nanoemulsões que os agentes da cromoblastomicose e por isso agir com igual ou maior efetividade que a formulação convencional. Em relação ao ensaio por nós realizado podemos levantar algumas hipóteses para não ter sido possível determinar a CIM para os agentes da cromoblastomicose. Tanto na nanoemulsão de anfotericina B quanto em Abelcet[®], o fármaco pode estar intercalado nos fosfolipídeos, de tal forma que pode acarretar no impedimento ou redução na liberação deste para o meio de cultura para que este esteja disponível para atuar. Além disso, não há condição sink no ensaio utilizado, o que também pode contribuir para que o fármaco não saia das nanogotículas. A anfotericina B solubilizada em deoxicolato sódico (Fungizone[®]) apresentou maior atividade antifúngica que o fármaco livre solubilizado em DMSO. O deoxicolato sódico possui propriedades detergentes que podem auxiliar na lise da membrana celular do fungo e isso explicaria a maior atividade desta formulação. O DMSO está em quantidade menor que 1% nos ensaios, concentração esta que não interfere no crescimento fúngico.

No modelo *in vivo*, não foi possível obter as formas escleróticas. Entretanto o experimento se mostrou válido por podermos avaliar a atividade de diferentes

formas de anfotericina B, bem como por podermos avaliar os efeitos destes tratamentos em um organismo complexo.

Neste estudo seguimos a forma indicada de administração de anfotericina B na cromoblastomicose: associação de administrações sistêmicas e administrações intralesionais (6, 8). Um fator que pode ter contribuído para o melhor desempenho da nanoemulsão de anfoterina B produzida, mesmo em relação à Abelcet[®] é a composição de óleos utilizadas na primeira formulação. Na elaboração da formulação foram utilizados os óleos de oliva e de peixe. O óleo de oliva apresenta o composto fenólico oleocantal, que possui atividade antiinflamatória, atuando na inibição da ciclooxigenase, enzima responsável pela biossíntese de prostaglandinas (36). O óleo de peixe é rico em ômega 3 (ácidos graxos poliinsaturados), sendo que estes compostos atuam inibindo enzimas pró-inflamatórias (37). A composição de óleos por si só não apresentou atividade antifúngica, mas quando em conjunto a anfotericina B, pode ter contribuído, de forma sinérgica, com a atividade antifúngica e por isso foram encontradas CIM inferiores para a nanoemulsão do que com às demais formulações. É conhecido que antiinflamatórios não esteroidais, em especial o diclofenaco, podem diminuir a produção de biofilmes e formação de hifas por *Candida albicans*, possivelmente através da inibição da biossíntese de prostaglandinas (38, 39). Estes relatos sugerem que os antiinflamatórios não esteroidais podem inibir a morfogênese de hifas e deste modo contribuir com a eficácia dos antifúngicos (40).

Os sistemas nanocarreadores lipídicos das formulações comerciais diferem entre si em vários aspectos, mas apesar disso, a anfotericina B em qualquer um destes veículos é menos tóxica às células dos mamíferos que a forma convencional (41). Neste sentido, conseguimos atingir o objetivo de que a formulação fosse

menos tóxica aos rins que Fungizone[®] e a anfotericina B solubilizada em DMSO. Comparada com Abelcet[®], os rins dos animais tratados com a nanoemulsão apresentaram maior necrose focal no túbulo proximal. Entretanto comparando os valores de uréia sanguínea dos dois grupos não há uma diferença significativa, mostrando que em ambos os grupos a função renal mantém-se semelhante. O mesmo ocorreu na análise dos fígados, em que apesar de todos os grupos apresentarem algum dano, a dosagem de alanina aminotransferase não foi significativamente diferente entre os grupos avaliados. É conhecido que muitas vezes uma lesão não representa perda de função do órgão. Os biomarcadores são indicadores mais fidedignos da função de um órgão (42).

O uso de Fungizone[®] é limitado também devido à sua intolerância hematológica. O ensaio de hemólise demonstrou que um mínimo de hemólise quando as hemácias foram tratadas com Abelcet[®] e com a nanoemulsão de anfotericina B. Outros estudos encontraram resultados similares para nanoemulsões e outras formulações lipídicas (24, 35). Neste sentido, a formulação desenvolvida pode ser seletiva para células fúngicas sobre células dos mamíferos, apesar da razão para esta seletividade não ser totalmente esclarecida. Alguns autores atribuem para a diminuição do potencial hemolítico a um aumento na seletividade da anfotericina B quando complexada para o ergosterol (24, 43).

A redução do potencial citotóxico da anfotericina B também pode ser vista também através do ensaio clonogênico. Enquanto a anfotericina B livre foi citotóxica em concentrações a partir de 4µg/mL, com a nanoemulsão a concentração de 10µg/mL não apresentou citotoxicidade, além de não poder se estimar o IC50. A anfotericina B não se mostrou mutagênica, assim como a nanoemulsão produzida.

Estes testes não são comumente utilizados quando são utilizados materiais biocompatíveis, aprovados para o uso pelas agências reguladoras. Entretanto, somente são conhecida suas características toxicológicas isoladamente, não quando em combinação com outras matérias-primas (18, 44, 45). Apesar do amplo desenvolvimento da nanotecnologia, o conhecimento sobre o efeito dos nanocarreadores sobre a saúde humana é praticamente ausente (46). Por isso, a avaliação dos sistemas nanoestruturados é necessária.

Deste modo, pudemos verificar que a nanoemulsão produzida apresenta excelente atividade antifúngica contra os agentes da cromoblastomicose *in vivo*, sendo menos nefrotóxica que a formulação convencional. A avaliação de sistemas nanoestruturados quanto à atividade antifúngica não deve ser realizada por métodos *in vitro*. Os ensaios toxicológicos mostram que a utilização da nanoemulsão seria segura e a sua produção ser facilmente escalonada, em virtude da técnica empregada. Neste sentido, a nanoemulsão de anfotericina B poderia ser, no futuro, uma alternativa para o tratamento para cromoblastomicose, uma micose negligenciada, que carece de opções terapêuticas.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro e bolsas de estudo. Processo CNPq n^o 482635/2010-0.

Referências

1. **Rippon JW.** 1982. Chromoblastomycosis and related dermal infections caused by dematiaceous fungi, p 249-276. *In* Rippon JW (ed), *The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*, 2nd ed, Med Mycol, Philadelphia: Saunders, WB.
2. **McGinnis MR.** 1983. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. *J Am Acad Dermatol.* 8:1-16.
3. **Queiroz-Telles F, McGinnis MR, Salkin I, Graybill JR.** 2003. Subcutaneous mycoses. *Infect Dis Clin North Am.* 17:59-85.
4. **Esterre P, Queiroz-Telles F.** 2006. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Curr Opin Infect Dis.* 19(2):148-152.
5. **Ameen M.** 2009. Chromoblastomycosis: clinical presentation and management. *Clin Exp Dermatol.* 34:849-854.
6. **Queiroz-Telles F, Esterre P, Perez-Blanco M, Vitale RG, Salgado CG, Bonifaz A.** 2009. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol.* 47(1):3-15.
7. **Fader RC, McGinnis MR.** 1988. Infections caused by dematiaceous fungi: chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2:925.
8. **Martínez RL, Tovar LJM.** 2007. Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol.* 25:188–194.
9. **Brajtbur J, Powderly WG, Kobayashi G, Medorff G.** 1990. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 34:183-188.

10. **Kleinberg M.** 2006. What is current and future status of conventional amphotericin B? *Int J Antimicrob Agents.* 27:12-16.
11. **Couvreur P, Vauthier C.** 2006. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm Res.* 23:1417–1450.
12. **Formariz TP, Urban MCC, Silva Júnior AA, Gremião MPD, Oliveira AG.** 2005. Microemulsão e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Braz J Pharm Sci.* 41(03):301-313.
13. **Mendonça CRB, Bica CID, Piatnicki CMS.** 2003. Water in Soybean Oil Microemulsions as Medium for Electrochemical Measurements. *J Braz Chem Soc.* 14(4):628-636.
14. **Oliveira AG, Scarpa MV, Correa MA, Cera LFR, Formariz TP.** 2004. Microemulsões: Estrutura e Aplicações como Sistema de Liberação de Fármacos. *Quim Nova.* 27(1):131-138.
15. **Anton N, Benoit JP, Saulnier P.** 2008. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates- A review. *J Control Release.* 128:185–199.
16. **Moreno MA, Frutos P, Ballesteros P.** 2001. Lyophilized lecithin based oil-water microemulsions as a new and low toxic delivery system for amphotericin B. *Pharm Res.* 18(3):344-351.
17. **Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJA.** 2004. Nanotoxicology. *Occup Environ Med.* 61:727–728.
18. **Souto EB, Martins-Lopes P, Lopes CM, Gaivão I, Silva AM, Guedes-Pinto H.** 2009. A Note on Regulatory Concerns and Toxicity Assessment in Lipid-Based Delivery Systems (LDS). *J Biomed Nanotechnol.* 5:317-322.

19. **Andriole VT.** 1999. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *Int J Antimicrob Agents.* 44:151-152.
20. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, 2nd ed. Approved standard M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
21. **Alexander BD, Wingard JR.** 2005. Study of renal safety in amphotericin B lipid complex-treated patients. *Clin Infect Dis.* 40(6):S414–421.
22. **Deray G.** 2002. Amphotericin B nephrotoxicity. *J Antimicrob Chemother.* 49(1):37–41.
23. **Olson JA, Adler-Moore JP, Jensen GM, Schwartz J, Dignani MC, Proffitt RT.** 2008. Comparison of the physicochemical, antifungal, and toxic properties of two liposomal amphotericin B products. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:259–268.
24. **Fukui H, Koike T, Saheki A, Sonoke S, Tomii Y, Seki J.** 2003. Evaluation of the efficacy and toxicity of amphotericin B incorporated in lipid nano-sphere (LNS®). *Int J Pharm.* 263:51–60.
25. **Fukui H, Koike T, Nakagawa T, Saheki A, Sonoke S, Tomii Y, Seki J.** 2003. Comparison of LNS-AmB, a novel low-dose formulation of amphotericin B with lipid nano-sphere (LNS®), with commercial lipid-based formulations. *Int J Pharm.* 267:101-112.
26. **Girois SB, Chapuis F, Decullier E, Revol BGP.** 2006. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol.* 25:138–149.

27. **Lundstrom TS, Fairfax MR, Dugan, Vazquez JA, Chandrasekar PH, Abella E, Kasten-Sportes C.** 1997. *Phialophora verrucosa* infection in a BMT patient. Bone Marrow Transplant. 20:789-791.
28. **Park SG, Oh SH, Suh SB, Lee KH, Chung KY.** 2005. A case of chromoblastomycosis with an unusual clinical manifestation caused by *Phialophora verrucosa* on an unexposed area: treatment with a combination of amphotericin B and 5-flucytosine. Br J Dermatol. 152:560-564.
29. **Almeida ME, Teixeira HF, Koester LS.** 2008. Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na atualidade. Lat Am J Pharm. 27(5):780-788.
30. **Hiemenz JW, Walsh TJ.** 1996. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. Clin Infect Dis. 22(2):33-44.
31. **Bock, T.** 1998. Manufacture of emulsions by means of high-pressure homogenization parameters, oils and surfactants, p 201-236. In Müller RH, Benita S, Böhn B (ed), Emulsions and Nanosuspensions for Formulation of Poorly Soluble Drugs. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, BW.
32. **Tabosa do Egito ES, Fessi H, Appel M, Puisieux F, Bolard J, Devissaguet JP.** 1994. New techniques for preparing submicronic emulsion: application to amphotericin B. STP Pharma Sci. 4(2):155-162.
33. **Filippin FB, Souza LC, Maranhão RC.** 2008. Amphotericin B associated with triglyceride-rich nanoemulsion: stability studies and *in vitro* antifungal activity. Quim Nova. 31(3):591-594.
34. **Pestana KC, Formariz TP, Franzini CM, Sarmento VH, Chiavacci LA, Scarpa MV, Egito ES, Oliveira AG.** 2008. Oil-in-water lecithin-based

- microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 66:253–259.
35. **Darole PS, Hegde DD, Nair HA**. 2008. Formulation and evaluation of microemulsion based delivery system for amphotericin B. *AAPS PharmSciTech*. 9(1):122-128.
36. **Cicerale S, Breslin PA, Beauchamp GK, Keast RS**. 2009. Sensory characterization of the irritant properties of oleocanthal, a natural anti-inflammatory agent in extra virgin olive oils. *Chem Senses*. 34(4):333-339.
37. **Massaro M, Scoditti E, Carliccio MA, De Caterina R**. 2008. Basic mechanisms behind the effects of n-3 fatty acids on cardiovascular disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 79:109-115.
38. **Alem MA, Douglas LJ**. 2005. Prostaglandin production during growth of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol*. 54:1001–1005.
39. **Erb-Downward JR, Noverr MC**. 2007. Characterization of prostaglandin E2 production by *Candida albicans*. *Infect Immun*. 75:3498–3505.
40. **Bink A, Kucharíková S, Neirinck B, Vleugels J, Dijck PV, Cammue BPA, Thevissen K**. 2012. The nonsteroidal antiinflammatory drug diclofenac potentiates the *in vivo* activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *J Infect Dis*. 206:1790–1797.
41. **Kohno K, Tomono K, Maesaki S**. 1998. Drug delivery systems for infection: liposome-incorporating antimicrobial drugs. *J Infect Chemother*. 4:159-173.
42. **Zheng J, Yao Y, Han L, Xiao Y**. 2013. Renal function and injury in infants and young children with congenital heart disease. *Pediatr Nephrol*. 28:99-104.

43. **Tasset C, Preat V, Bernard A, Roland M.** 1992. Comparison of nephrotoxicities of different polyoxyethyleneglycol formulations of amphotericin B in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 36(7):1525–1531.
44. **Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW.** 2007. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol.* 150(5):552-558.
45. **Durnev AD.** 2008. Toxicology of Nanoparticles. *Bull Exp Biol Med.* 145 (1):72-74.
46. **Bimbo LM, Peltonen L, Hirvonen L, Santos HA.** 2012. Toxicological Profile of Therapeutic Nanodelivery Systems. *Curr Drug Metab.* 13:1068-1086.

Tabela 1. Avaliação da atividade antifúngica de anfotericina B livre, Fungizone[®], Abelcet[®] e nanoemulsão de anfotericina B em agentes da cromoblastomicose. Valores expressos em Média Geométrica das Concentrações Inibitórias Mínimas (MG CIM) .

MG CIM ($\mu\text{g/mL}$)				
	Anfotericina B Livre	Fungizone [®]	Nanoemulsão de Anfotericina B	Abelcet [®]
<i>Cladophialophora carrionii</i> (n= 6)	3,175	1,123	> 256	> 256
<i>Fonsecaea spp.</i> (n=44)	3,937	1,604	> 256	> 256
<i>Exophiala spinifera</i> (n=2)	4	2	> 256	> 256
<i>Phialophora verrucosa</i> (n=6)	6,345	1,782	> 256	> 256
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i> (n=2)	4	2	> 256	> 256

Tabela 2. Contagem de colônias obtidas após inoculação das patas maceradas dos camundongos BALB/c em Agar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e incubadas a 26 °C por 10 dias, para os diferentes tratamentos testados.

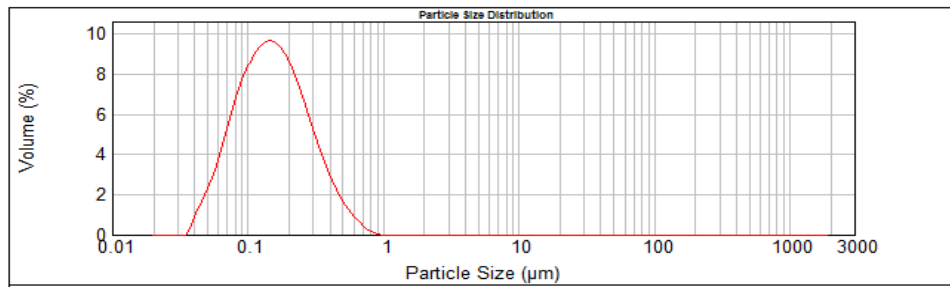
	Nanoemulsão Anfotericina B	Abelcet [®]	Fungizone [®]	Anfotericina B Livre	Nanoemulsão Branca	Água Glicosada	Controle
Nº Colônias (média)	0,33	3,25	3,20	3,40	4,88	4,71	4,88
Desvio Padrão	0,71	3,33	3,38	3,89	3,14	2,87	3,26

Tabela 3: Níveis de uréia obtidos para os diferentes tratamentos pelo método enzimático UV. (Valores expressos em mg/dL de sangue).

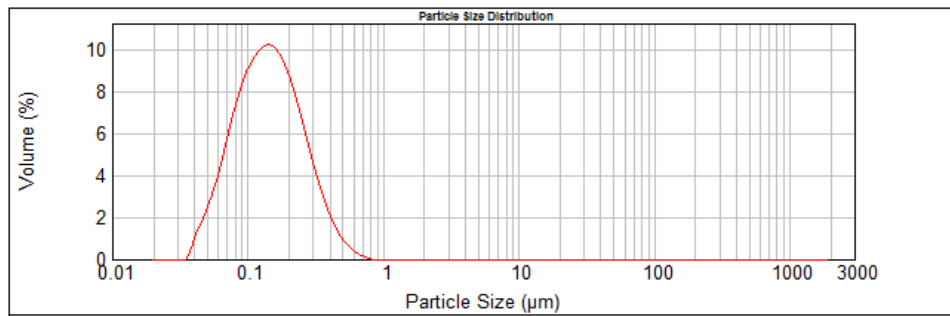
	Nanoemulsão Anfotericina B	Abelcet [®]	Fungizone [®]	Anfotericina B Livre	Nanoemulsão Branca	Água Glicosada	Controle
Uréia	63,33	61,67	70,13	83,1	54,5	54,43	53,78
Desvio Padrão	2,18	2,18	2,80	2,03	2,20	2,37	2,44

a

Concentration: 0.0074 %Vol	Span : 1.782	Uniformity: 0.563	Result units: Volume
Specific Surface Area: 48 m ² /g	Surface Weighted Mean D[3,2]: 0.125 um	Vol. Weighted Mean D[4,3]: 0.182 um	
d(0.1): 0.070 um	d(0.5): 0.149 um	d(0.9): 0.337 um	

**b**

Concentration: 0.0091 %Vol	Span : 1.612	Uniformity: 0.512	Result units: Volume
Specific Surface Area: 50.5 m ² /g	Surface Weighted Mean D[3,2]: 0.119 um	Vol. Weighted Mean D[4,3]: 0.166 um	
d(0.1): 0.069 um	d(0.5): 0.141 um	d(0.9): 0.295 um	

**c**

Concentration: 0.0107 %Vol	Span : 1.614	Uniformity: 0.515	Result units: Volume
Specific Surface Area: 50.6 m ² /g	Surface Weighted Mean D[3,2]: 0.119 um	Vol. Weighted Mean D[4,3]: 0.166 um	
d(0.1): 0.068 um	d(0.5): 0.140 um	d(0.9): 0.295 um	

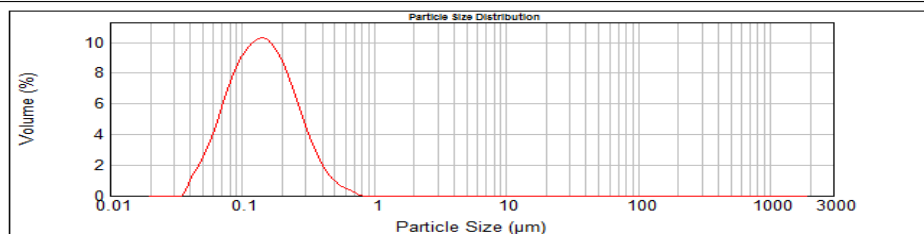


Figura 1. Índice de polidispersão e tamanho de gotícula médio obtido para a nanoemulsão de anfotericina B em 3 (a), 6 (b) e 9 (c) ciclos de 500 bar.

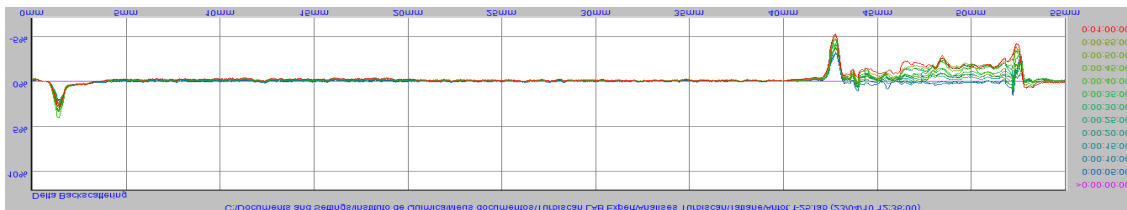


Figura 2. Análise de retroespalhamento de luz dinâmico obtido para a nanoemulsão de anfotericina B.

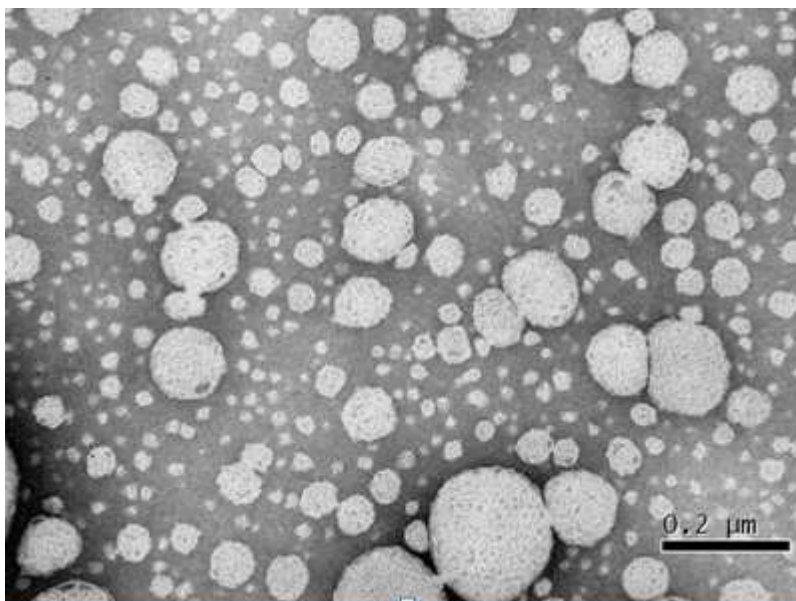


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão da nanoemulsão de anfotericina B.

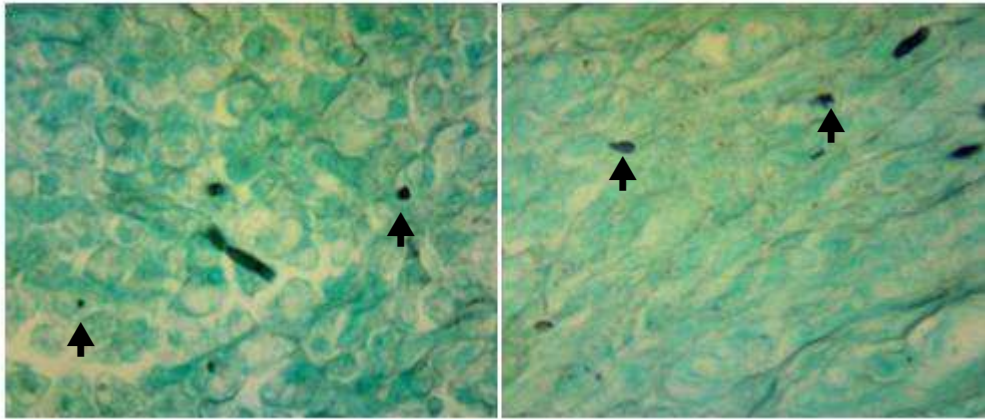


Figura 4. Cortes histológicos das patas de camundongos Balb/C machos após 15 dias da inoculação. Presença majoritária de esporos. Coloração Grocott - 100x

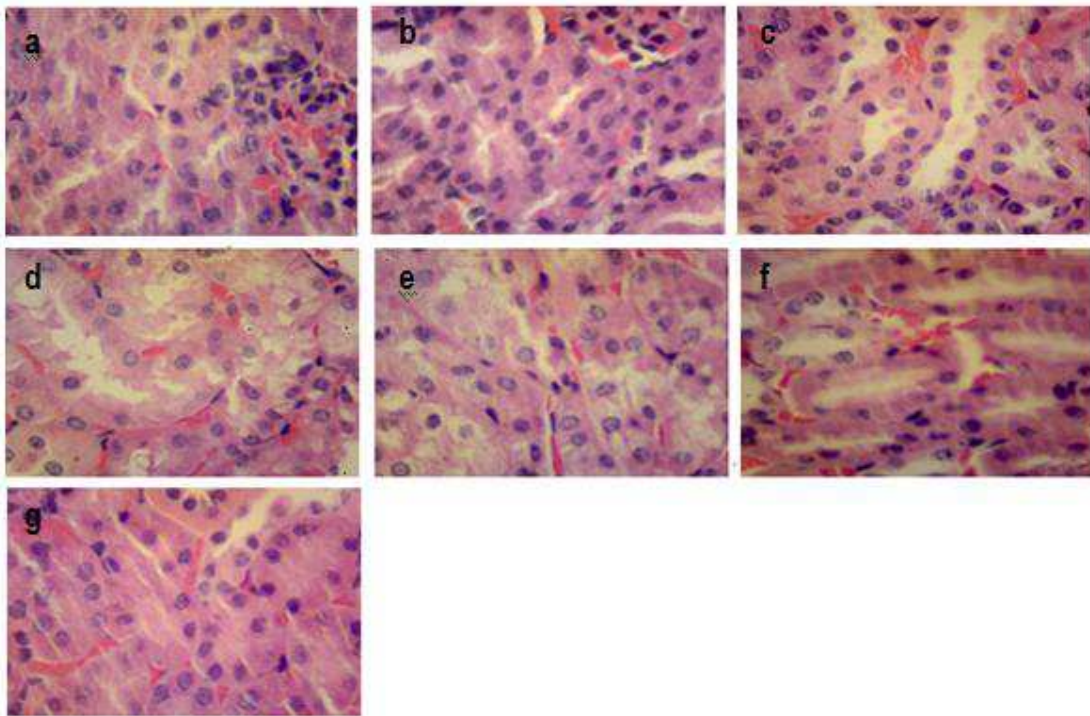


Figura 5. Análise histopatológica dos rins nos diferentes tratamentos: (a) controle, (b) água glicosada, (c) nanoemulsão branca, (d) anfotericina B livre, (e) Fungizone[®], (f) Abelcet[®], (g) nanoemulsão de anfotericina B. Coloração H&E – 40x.

Capítulo II: Suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* de agentes da cromoblastomicoses à nanoemulsão de itraconazol. (Artigo Formatado de Acordo com as Normas da Revista Journal of Antimicrobial Chemotherapy)

Suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* de agentes da cromoblastomicose à nanoemulsão
de itraconazol

Tatiane Caroline Daboit^{1,2}, Cibele Massotti Magagnin^{1,2}, Miriana da Silva Machado³,
Daiane Heidrich^{1,2}, Suelen Vigolo², Lúcia Collares Meirelles², Sílvia Stanisçuaski
Guterres⁵, João Antônio Pegas Henriques^{3,4}, Maria Isabel Edelweiss¹, Maria Lúcia
Scroferneker^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

² Departamento de Microbiologia, Imunologia and Parasitologia, ICBS, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

³ Genotox – Royal, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Brasil.

⁴ Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.

⁵ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Título curto: Nanotecnologia e agentes da cromoblastomicose

Palavras-chave: itraconazol, nanoemulsão, *Fonsecaea pedrosoi*, agentes da cromoblastomicose, nanotoxicologia.

*Autores correspondentes. Tel.: +55 51 3308 3934. Fax: +55 51 3308 3121

e-mail: tatidaboit@gmail.com / scrofern@ufrgs.br

Resumo

Objetivos: Uma nanoemulsão de itraconazol para administração parenteral foi avaliada quanto à sua atividade *in vitro* e *in vivo* em agentes da cromoblastomicose, bem como em relação ao seu potencial toxicológico.

Métodos: A nanoemulsão foi produzida pela técnica de homogeneização à alta pressão e caracterizada quanto ao tamanho de gotícula e polidispersão, potencial zeta, viscosidade, pH, taxa de associação, concentração de fármaco e quanto à presença de fenômenos de instabilidade. Na avaliação *in vitro* da atividade antifúngica foi empregado o protocolo M38-A2 do CLSI. Na avaliação *in vivo*, uma suspensão de esporos com concentração de 10^6 UFC/mL da cepa de *Fonsecaea pedrosoi* 46428 ATCC foi inoculada em camundongos BALB/c nas patas traseiras e peritônio. Após 15 dias da inoculação os animais foram tratados até o 30º dia. Análises histopatológicas de rins, fígado e patas foram realizadas. Os parâmetros bioquímicos (uréia, creatinina e alanina transferase) também foram analisados. Quanto aos ensaios toxicológicos, foram empregados os testes *Salmonella*/microsoma e clonogênico.

Resultados: A nanoemulsão produzida mostrou características satisfatórias para a administração parenteral, apresentou atividade antifúngica *in vitro* semelhante ao

fármaco livre. No ensaio *in vivo*, os animais tratados com a nanoemulsão apresentaram um menor crescimento de colônias fúngicas e reduzida toxicidade hepática quando comparados com os tratados com itraconazol. A redução na toxicidade foi confirmada pela dosagem de alanina aminotransferase. Nos ensaios toxicológicos, o itraconazol foi citotóxico na concentração de 0,41µg/mL, enquanto que a nanoemulsão não foi na concentração de 4,915 µg/mL.

Conclusão: A formulação foi segura e eficaz contra agentes da cromoblastomicose.

Introdução

A cromoblastomicose é uma infecção micótica, cutânea e subcutânea, causada por fungos negros saprófitos, que são onipresentes no ambiente.¹ A infecção é causada por inoculação traumática do agente etiológico através da pele, geralmente por espinhos contaminados ou lascas.² Os pacientes com cromoblastomicose são um desafio terapêutico. Dos medicamentos e procedimentos descritos na literatura para o tratamento desta doença, nenhum podem ser considerado de escolha, devido ao baixo índice de eficácia a longo prazo.^{1,3} O tratamento é longo e sujeito a recidivas na maior parte dos casos. Um dos principais fármacos utilizados no tratamento da cromoblastomicose é o itraconazol.⁴ Este fármaco pertence à classe dos azólicos, os quais atuam inibindo a lanosterol 14 α -demetilase, bloqueando, desta forma, a demetilação do lanosterol em ergosterol, o que altera a permeabilidade e a fluidez normal da membrana, bem como a síntese da parede celular fúngica.⁵ O principal efeito adverso deste fármaco é a hepatotoxicidade.⁶ Além disso, sua biodisponibilidade não é adequada quando administrado na forma convencional por via oral.⁷ O desenvolvimento de preparações nanoestruturadas para as vias intravenosa e oral, fez com que os problemas relativos à biodisponibilidade fossem superados.^{8,9} Entretanto o nanocarreador utilizado, a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, está associado à toxicidade renal, fazendo com que estudos nesta área sejam necessários.¹⁰

Nanoemulsões são dispersões formadas por duas fases líquidas, sendo que uma delas é uma solução aquosa e a outra, uma fase orgânica. São sistemas nanoestruturados amplamente empregados na veiculação de fármacos, em especial para a via parenteral.^{11,12}

Os nanossistemas de diversas origens vêm sendo utilizadas na terapêutica. Apesar do amplo desenvolvimento da nanotecnologia, o conhecimento sobre o efeito dos nanocarreadores sobre a saúde humana é praticamente ausente.¹³ No entanto, mesmo os primeiros estudos revelaram novas propriedades gerais e biológicas para materiais conhecidos, que são adquiridas quando estas matérias-primas são transformadas em nanopartículas.^{14,15} Então houve o surgimento de uma nova área de estudo dentro na nanotecnologia, a denominada nanotoxicologia, que é a ciência que examina os efeitos de nanoestruturas artificialmente projetadas e os nanomecanismos sobre os organismos vivos.¹⁵ Neste sentido, até mesmo formulações produzidas com materiais biocompatíveis devem ser avaliadas quanto à toxicidade.¹⁶

Assim, o objetivo deste trabalho foi produzir uma nanoemulsão de itraconazol para administração parenteral e avaliar sua atividade *in vitro* e *in vivo* em agentes da cromoblastomicose, fazendo-se uma comparação com o fármaco livre. Além disso, a formulação será avaliada toxicologicamente e comparada com o fármaco livre.

Métodos

Preparo da nanoemulsão de itraconazol

Para a produção da nanoemulsão foram utilizadas matérias-primas e concentrações aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) para administração parenteral. A composição da nanoemulsão foi baseada em fórmulas empregadas em nutrição parenteral, sendo que os óleos empregados foram escolhidos por apresentarem atividade antiinflamatória, para que pudessem atuar

contribuindo com a redução da inflamação, geralmente presente na cromoblastomicose.

Foram preparadas duas fases distintas, uma fase orgânica composta por: óleo de peixe purificado (Lipoid[®]) (2,0%), óleo de oliva purificado (Lipoid[®]) (8,0%), Lipoid[®] S-40 (Lipoid[®]) (1,0%) e vitamin E pó (Galena Química e Farmacêutica) (0,05%), que aquecida até a temperatura de 40°C em banho-maria com agitação, a fim de solubilizar os componentes. Após esta fase foi arrefecida à temperatura ambiente, adicionado o itraconazol (Sigma[®]) (1,0 mg/mL) e mantida sob agitação. A fase aquosa, composta por Pluronic[®] F-68 (Sigma[®]) (1,0%), glicerina (Synth[®]) (2,5%) e água Milli Q[®] em quantidade suficiente para 100 mL, também foi aquecida até a temperatura de 40°C para a solubilização dos componentes.

Ambas as fases foram misturadas e homogeneizadas com auxílio do Ultra-Turrax (T25, Ika), a 16000 rpm por 5 min. Após, a pré-emulsão obtida foi homogeneizada a alta pressão com refrigeração (Panda 2K NS1001L, Niro Soavi) aplicando-se 9 ciclos de 500 bar. Foi preparada uma nanoemulsão da mesma forma e com os mesmos componentes, mas sem a presença de fármaco (nanoemulsão branca) para fins de comparação. As preparações foram estocadas a 4°C.

Caracterização da Nanoemulsão

A nanoemulsão de itraconazol produzida foi caracterizada segundo tamanho de gotícula e polidispersão, potencial zeta, pH, viscosidade, taxa de associação, concentração de fármaco e quanto à presença de possíveis fenômenos de instabilidade.

A determinação do diâmetro e da polidispersão da nanoemulsão foi realizada pela técnica de difração de laser (Mastersizer 2000, Malvern), microscopia eletrônica de transmissão (Jeol, JEM 1200 ExII) e através de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer[®] nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern). O pH foi medido através de potenciômetro (B474 Micronal) diretamente na nanoemulsão. O potencial zeta da nanoemulsão foi obtido através de eletroforese (Zetasizer[®] nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern). A viscosidade foi determinada com viscosímetro rotacional Brookfield, modelo LVDV-II+ Pro com spindle ULA.

A quantidade declarada de itraconazol na formulação foi avaliada através do tratamento da mesma com acetonitrila a fim de extrair o ativo da nanoemulsão. Para quantificação do ativo, uma alíquota do extraído foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Perkin Elmer Series 200, UV/Vis, $\lambda = 263$ nm). A fase móvel era composta de acetonitrila e água na proporção de 60:40, com adição de ácido fosfórico até pH 3,0. O método analítico foi validado. A concentração de itraconazol associado à nanoemulsão também foi avaliada, considerando-se a diferença entre a concentração total de itraconazol na formulação e a concentração de itraconazol livre, contida na fase aquosa da formulação. Esta determinação foi realizada através de ultrafiltração-centrifugação das dispersões (membrana de nylon - porosidade 0,45 μm) quantificando-se o itraconazol B livre no ultrafiltrado por CLAE. A presença de fenômenos de instabilidade da nanoemulsão de itraconazol foi verificada através de retroespalhamento de luz (Turbiscan Lab[®]). As análises foram realizadas a 25 °C por 1h com *scans* a cada 5 minutos. A estabilidade da nanoemulsão também foi avaliada em 15, 30, 45 e 60 dias após o preparo, através de doseamento e determinação do tamanho de gotícula.

Ensaio de suscetibilidade *in vitro*

A avaliação da atividade antifúngica da nanoemulsão de itraconazol frente aos agentes da cromoblastomicose foi de acordo com o documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).¹⁷ Uma suspensão de esporos foi preparada a partir de repiques dos fungos crescidos por 7 dias a 35°C em agar batata (BD, Franklin Lakes, USA). A concentração de esporos na suspensão foi ajustada em espectrofotômetro em $\lambda = 530$ nm. Os inóculos de *Fonsecaea spp.* (n=44), *P. verrocosa* (n=6), *C. carrionii* (n=6) e *R. aquaspersa* (n=2) foram padronizados na faixa de transmitância de 68-70% e para a o inóculo de *E. spinifera* (n=2) foi utilizada a faixa de transmitância de 80-82%, transmitâncias estas que correspondem a uma concentração final na placa de 1.5×10^4 to 4×10^4 UFC/mL. A viabilidade dos inóculos foi confirmada por plaqueamento. Também foi avaliada a atividade do itraconazol livre solubilizado em DMSO e da nanoemulsão branca. A faixa de concentração avaliada para todos os tratamentos foi de 0,03 - 16 $\mu\text{g/mL}$. A nanoemulsão branca foi avaliada em volume idêntico ao volume utilizado de nanoemulsão de itraconazol. As placas foram incubadas a 35 °C por até 120 h. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram determinadas visualmente por comparação com o controle de crescimento e o controle de esterilidade, e foi definida como a menor concentração de fármaco que produziu 100% de inibição. *Candida krusei* ATCC 6258 foi utilizada como controle de qualidade e incluída em todos os ensaios realizados.

Determinação da atividade antifúngica *in vivo*

A amostra *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428 foi inicialmente inoculada em 4 animais distintos para melhorar sua virulência. Para tanto, a amostra foi cultivada em

ágar batata por 10 dias a 26 °C. A partir desta cultura foi preparada uma suspensão de esporos e hifas, que foi quantificada em hemocítômetro e ajustada em 10^7 UFC/mL. Esta suspensão foi inoculada em três pontos da região dorsal, pela via subcutânea, em camundongo BALB/c. O camundongo foi mantido por 21 dias e após eutanasiado. A amostra de fungo foi coletada do animal e crescida em agar Sabouraud- dextrose com cloranfenicol. Este procedimento foi realizado para outros três animais.

Após esta etapa, a linhagem foi cultivada novamente em agar batata por 10 dias a 26°C e a partir destas colônias foi produzida uma suspensão de esporos, onde 2 mL desta foram colocados em cada placa de agar sangue e crescidas a 26 °C por 10 dias. A partir destas culturas foi produzida uma suspensão de esporos contendo 10^6 UFC/mL, a qual foi inoculada em camundongos Balb/C machos com 6 a 8 semanas, pesando em média 29 g, intraperitonealmente (100 µL) e em cada uma das patas traseiras do animal (50 µL). Diluições da suspensão original foram cultivadas em placas de Agar batata para avaliação da viabilidade. Após 15 dias da inoculação foi iniciado o tratamento dos animais, até o 30º dia. Os animais foram divididos randomicamente em cinco grupos contendo nove animais em cada. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em fotoperíodo de 12 horas de claro / 12 horas de escuro, temperatura controlada de 24 °C, alimentados com ração padrão para roedores e água *ad libitum*. Foram realizadas administrações diárias, sendo quatro administrações intralesionais intercaladas com administrações intraperitoneais e no restante dos dias foram feitas apenas aplicações intraperitoneais. A dose de itraconazol (nanoemulsão de itraconazol e itraconazol solubilizado em DMSO) foi de 2,85 mg/kg/dia, sendo que esta dose é proporcional à dose empregada em humanos. Foram incluídos na avaliação animais infectados sem tratamento, animais

que receberam água glicosada (utilizada para a diluição das medicações) e animais que receberam a nanoemulsão branca. No 31º dia foi realizada a retirada do sangue destes animais pela via intracardíaca, após anestesia com isoflurano, para realização de exames bioquímicos (creatinina pelo método Jaffé sem desproteinização, alanina aminotransferase pelo método UV cinético e uréia pelo método enzimático UV). Finalizado este processo, os animais foram eutanaziados em câmara de CO₂ e a partir disso, foram separadas as patas traseiras, sendo que de cada animal, uma das patas foi macerada com solução salina estéril e colocada em agar Sabouraud-dextrose acrescido de cloranfenicol e incubada a 26 °C por 10 dias e com a outra foi realizada uma análise histopatológica. A eficácia dos diferentes tratamentos foi avaliada pela contagem do nº de colônias obtidas em relação ao controle sem tratamento. Foram também retirados os rins e o fígado dos animais para avaliação histopatológica. Para os estudos histopatológicos, as peças foram fixadas com formalina tamponada 10% e após foram devidamente tratadas e cortadas. Foram realizadas as colorações hematoxilina e eosina (H&E) para todos os órgãos avaliados e coloração Grocott exclusivamente para as patas. As lâminas foram examinadas por microscopia óptica. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os ensaios foram supervisionados pela equipe técnica da Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do HCPA.

Avaliação da Toxicidade dos Tratamentos

A nanoemulsão de itraconazol foi avaliada quanto a seu potencial citotóxico e mutagênico, quando comparado com o fármaco livre.

Células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês) foram mantidas em cultura contínua em garrafas de 25 cm². O cultivo foi realizado em meio DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina (0,2 mg/mL L-glutamina, incluído no protocolo de formação de colônia). A incubação foi a 37⁰C sob atmosfera úmida (90%) com 5% de CO₂/ar. Para desgrudar as células dos frascos de cultura foi utilizado tratamento com 0,15% de tripsina e 0,08% de EDTA em PBS. Após, a linhagem V79 foi incubada em placas para cultura de células com seis poços na concentração de 200 células por poço, sendo três poços por grupo de tratamento. As células foram crescidas em 2 mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high glucose - Gibco), suplementado com soro bovino fetal e antibióticos por 24 ± 1 horas a 37 ± 1 °C e 5% de CO₂. No experimento Clonogênico – Escolha de Doses, as células foram incubadas em meio de cultura por 24 ± 1 horas a 37 ± 1 °C e 5 % de CO₂ com o controle negativo ou com a substância teste (itraconazol livre ou nanoemulsão de itraconazol). No experimento Clonogênico – Citotoxicidade, as células também foram tratadas por 24 ± 1 horas a 37 ± 1°C e 5 % de CO₂ com o controle negativo (DMSO 0,5%), substância teste e com o controle positivo (DMSO nas concentrações de 0,5, 1, 2, 4 e 8 %). Após os tratamentos, o meio de cultura foi aspirado, as células foram lavadas com PBS e reincubadas com meio de cultura a 37 ± 1 °C e 5 % de CO₂. Após sete dias do início do ensaio, o meio de cultura foi aspirado, as células foram fixadas e coradas com uma solução de cristal violeta 0,1 % e as colônias visíveis foram contadas.

No Teste *Salmonella*/microsoma -Mutagenicidade foram avaliadas diferentes concentrações da amostra utilizando as linhagens TA98, TA100, TA97a, TA1535 e TA102 na presença e ausência de fração pós-mitocondrial de fígado - S9

(Moltax™). As linhagens serão incubadas por 20-30 minutos com a amostra na presença e ausência de ativação metabólica, sendo posteriormente homogeneizadas com ágar de superfície e espalhado em placas de meio mínimo para incubação por 48-72 horas a 37°C. Foram usadas placas em triplicata, incluindo os controles negativo e positivo. Após o período de incubação, o número de colônias revertentes será contado. O Teste *Salmonella*/microsoma – Escolha de doses foi realizado da mesma forma, mas utilizado apenas a linhagem TA 100.

Análises estatísticas

Na caracterização da nanoemulsão são empregados os valores de média e desvio-padrão de três lotes distintos.

Na determinação da concentração inibitória mínima, avaliação quantitativa das colônias obtidas do macerado das patas e no ensaio de hemólise foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com teste Post-Hoc de Dunn. Quando $p < 0,05$, as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes.

Os dados de ensaios com células V79 foram expressos em média e desvio padrão e analisados estatisticamente por ANOVA de uma via com teste de Tukey de comparações múltiplas, utilizando o software GraphPad Prism 4,00. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Dados de mutagenicidade em bactérias foram analisados usando o software Salmonel. Um composto foi considerado positivo para mutagenicidade apenas quando: (a) o número de revertentes foi de pelo menos o dobro do rendimento espontâneo ($IM \geq 2$ - índice mutagênico: número de colônias induzidas na amostra / número de colônias espontâneas no controle negativo), (b) uma resposta significativa

foi determinada por análise de variância ($p \leq 0,05$), e (c) quando houve uma dose-resposta positiva reprodutível ($P \leq 0,01$).

Resultados

Preparo e caracterização da nanoemulsão de itraconazol

A nanoemulsão de itraconazol produzida possui distribuição de tamanho totalmente na faixa nanométrica, com diâmetro médio de 181 ± 4 nm) e índice de polispersão de $1,69 \pm 0,01$. Apresentou pH $6,0 \pm 0,2$, que é condizente com as matérias-primas e método de preparo empregado. O potencial zeta encontrado foi de $-28,4 \pm 1,01$ mV, valor este considerado adequado para manter o sistema sem agregação e precipitação das nanoestruturas, devido à repulsão eletrostática que as mesmas apresentam, resultante da carga de superfície. A viscosidade foi de $1,86 \pm 0,1$ cP, demonstrando um perfil newtoniano. A concentração de fármaco na nanoemulsão obtida por doseamento foi de $0,972 \pm 0,07$ mg/mL. Com relação à taxa de associação, esta foi de 86,1%. Na análise de retroespalhamento de luz dinâmico pode-se verificar que não houve variação do backscattering, o que significa que não há fenômenos de instabilidade nesta formulação.

Realizou-se uma avaliação da formulação por microscopia eletrônica de transmissão. As imagens obtidas demonstram estruturas esféricas, bem como tamanho de partícula e polidispersão condizentes com as outras técnicas empregadas (Figura 1).

A estabilidade das formulações produzidas foi avaliada. As nanoemulsões (itraconazol e branca) são estáveis por 30 dias conservadas em geladeira. Há o surgimento de uma população micrométrica após 45 dias de estocagem em geladeira, mas não havendo redução no teor de fármaco.

Uma nanoemulsão branca, sem itraconazol, foi igualmente preparada e caracterizada. O diâmetro médio obtido foi de 171 ± 3 nm e polidispersão $1,637 \pm 0,01$, o potencial zeta $-22,7 \pm 1,07$ mV , pH foi de $6,22 \pm 0,1$ e viscosidade ($2 \pm 0,1$ cP). Estes resultados indicam que a presença do fármaco na nanoemulsão não altera os parâmetros analisados.

Ensaio de suscetibilidade *in vitro*

Pode-se verificar que houve um pequeno incremento na atividade do fármaco quando em nanoemulsão nos isolados de *Fonsecaea* spp., mas de forma geral o itraconazol livre e a nanoemulsão possuem atividade antifúngica muito semelhante contra agentes da cromoblastomicose (tabela 1), não apresentando diferenças estatísticas significantes entre os dois grupos. A nanoemulsão branca não apresentou atividade antifúngica.

Determinação da atividade antifúngica *in vivo*

A nanoemulsão de itraconazol apresentou atividade antifúngica superior ao fármaco livre, dados estes que estão apresentados na tabela 2. Através dos exames bioquímicos pudemos verificar que não houve alteração nos níveis de creatinina e uréia nos diferentes tratamentos em relação ao grupo controle. Os níveis de alanina aminotransferase não foram diferentes do grupo controle, para todos os grupos avaliados.

Pode-se observar através da avaliação histopatológica que nas patas de animais eutanaziados após 15 dias da inoculação (início dos tratamentos), há a presença majoritária de esporos nos tecidos, próximo à camada córnea, com raras

hifas. As células fúngicas não se transformaram em células escleróticas. Há, ainda, a presença de reação granulomatosa e certo grau de fibrose (Figura 2).

Com a avaliação da enzima alanina aminotransferase (tabela 3), pudemos verificar que os níveis desta enzima encontraram-se menores nos animais que receberam a nanoemulsão de itraconazol quando comparados com os animais que receberam itraconazol livre, sugerindo que a nanoemulsão reduz os efeitos hepatotóxicos causados pelo itraconazol. Os demais grupos não diferiram em relação ao controle.

Na análise dos fígados dos animais tratados (Figura 3), verificou-se que a água glicosada, veículo utilizado para diluir as medicações, causou alterações hepáticas e conseqüentemente em todos os tratamentos há a presença de certo grau de processo degenerativo citoplasmático. Nos animais tratados com itraconazol foi possível verificar a presença de necrose multifocal. Nos animais tratados com a nanoemulsão, eventualmente foi visualizada a presença de necrose focal, caracterizada pelo desaparecimento dos núcleos, nas proximidades da veia centrolobular (zona 3). Descontando os efeitos da água glicosada, a maior parte dos animais tratados com a nanoemulsão apresentaram fígados com características muito semelhantes ao grupo controle. Na análise dos rins não foram visualizadas alterações nos diferentes tratamentos em relação ao grupo controle.

Avaliação da Toxicidade dos Tratamentos

No experimento Clonogênico – Escolha de Doses, a linhagem foi incubada com o controle negativo ou com itraconazol nas concentrações de 0,0011, 0,011, 0,11, 1,1, 11 µg/mL. A substância teste induziu diminuição na viabilidade celular de maneira dose resposta e, pela aplicação da regressão não linear, o valor de 1,12

$\mu\text{g/mL}$ foi estimado como IC50. Com base nos resultados do experimento Clonogênico – Escolha de Doses, o experimento Clonogênico– Citotoxicidade foi realizado com o itraconazol nas concentrações de 0,14, 0,41, 1,22, 3,67 e 11 $\mu\text{g/mL}$. O itraconazol foi considerado citotóxico nas concentrações a partir de 0,41 $\mu\text{g/mL}$ para fibroblastos de pulmão de hamster chinês – células V79. Além disso, a substância teste apresentou o valor de 3,77 $\mu\text{g/mL}$ como valor de IC50, ou seja, a concentração mínima que induz morte celular em 50 % da população tratada.

No ensaio Clonogênico – Escolha de Doses, a linhagem foi incubada com o controle negativo ou com a nanoemulsão de itraconazol nas concentrações de 0,0004915, 0,004915, 0,04915, 0,4915, 4,915 $\mu\text{g/mL}$, como concentrações finais do princípio ativo. A nanoemulsão não induziu diminuição na viabilidade celular de maneira dose-resposta e, portanto, não foi possível determinar um valor de IC50 pela aplicação da regressão não linear. Com base nos resultados do experimento Clonogênico – Escolha de Doses, o experimento Clonogênico – Citotoxicidade foi realizado com a nanoemulsão de itraconazol nas concentrações de 0,307, 0,614, 1,229, 2,457 e 4,915 $\mu\text{g/mL}$, como concentrações finais do princípio ativo. Assim a nanoemulsão de itraconazol não foi considerada citotóxica na faixa de concentração de 0,307 a 4,915 $\mu\text{g/mL}$, como concentrações finais do princípio ativo, para fibroblastos de pulmão de hamster chinês.

Tanto nos experimentos realizados com o itraconazol quanto nos realizados com a nanoemulsão de itraconazol, foi utilizado o controle positivo DMSO nas concentrações de 0,5, 1, 2, 4 e 8%. Este composto apresentou o valor de IC50 de 2,15 e 2,18 % respectivamente (estimados pela regressão não linear). Estes valores são similares aos dados do histórico do laboratório, o que confirma a validade do experimento.

O Teste *Salmonella*/microsoma- Escolha de Doses foi realizado com a linhagem TA100, em ausência e em presença de metabolização, nas mesmas condições descritas para o teste *Salmonella*/microsoma- Mutagenicidade. As concentrações de itraconazol utilizadas foram de 0,035, 0,176, 0,88, 4,4 e 22 µg/placa em presença e ausência de metabolização, sendo a dose máxima testada determinada conforme o limite da solubilidade da substância teste. Nenhuma das concentrações testadas mostrou toxicidade, porém as concentrações na faixa de 0,176 - 0,88 µg/placa mostraram aumento no número de revertentes em ausência de metabolização. Assim, as concentrações escolhidas para o teste *Salmonella*/microsoma – Mutagenicidade foram de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 µg/placa em ausência e 4,4, 8,8, 13,2, 17,6 e 22 µg/placa em presença de metabolização. O itraconazol não apresentou toxicidade em nenhuma das linhagens e concentrações testadas no teste *Salmonella*/microsoma – Mutagenicidade. Deste modo, o itraconazol apresentou resultados negativos para mutagenicidade, não sendo capaz de induzir mutação reversa nas linhagens de *S. typhimurium* TA100, TA98, TA97a, TA102 e TA1535, quando testadas até a concentração de 1 µg/placa em ausência de metabolização e 22 µg/placa em presença de fração metabolizante de fígado de rato de S9.

O teste *Salmonella*/microsoma- Escolha de Doses foi realizado com a linhagem TA100, em ausência e em presença de metabolização, nas mesmas condições descritas para o teste *Salmonella*/microsoma – Mutagenicidade. As concentrações utilizadas foram de 0,008, 0,04, 0,2, 1 e 5 µL/placa em presença e ausência de metabolização, sendo a dose máxima testada determinada conforme o limite da solubilidade da substância teste. Nenhuma das concentrações testadas mostrou toxicidade. Assim, as concentrações escolhidas para o teste

Salmonella/microsoma – Mutagenicidade foram de 1, 2, 3, 4 e 5 µL/placa em ausência e em presença de metabolização. Os 5 µL equivalem a 4,875 µg de itraconazol. A substância teste não apresentou toxicidade em nenhuma das linhagens e concentrações testadas no *Salmonella*/microsoma – Mutagenicidade. Assim, a nanoemulsão de itraconazol apresentou resultados negativos para mutagenicidade, não sendo capaz de induzir mutação reversa nas linhagens de *S. typhimurium* TA100, TA98, TA97a, TA102 e TA1535, quando testadas até a concentração de 5 µL/placa em ausência e em presença de fração metabolizante de fígado de rato de S9.

Discussão

Neste trabalho teve-se como objetivo avaliar a atividade antifúngica de uma nanoemulsão de itraconazol por nós produzida em agentes da cromoblastomicose através de ensaio *in vitro* e modelo animal, bem como avaliar a segurança desta formulação com relação à toxicidade.

O itraconazol é um dos fármacos mais utilizados e com melhor eficácia no tratamento da cromoblastomicose.^{1,4} Entretanto, tratamentos com fármacos antifúngicos realizados por 6 meses ou menos podem resultar em resultados clínicos favoráveis momentaneamente, entretanto recidivas são comuns durante e após o término da terapia.¹ Assim, verifica-se ser necessário longos períodos de tratamento, o que leva muitas vezes ao abandono da terapia, muito também em virtude dos efeitos adversos associados ao fármaco. Em relação a estes efeitos, o uso de itraconazol foi associado com casos sérios de hepatotoxicidade, incluindo falência hepática e óbito. O mecanismo para isso ainda permanece desconhecido, no entanto, sabe-se que é dose-dependente. Com o aumento da dose podem ser observados níveis elevados de alanina aminotransferase e fosfatase alcalina, além

de necrose hepatocelular, degeneração dos hepatócitos, hiperplasia do ducto biliar e cirrose.⁶ Além disso, sua biodisponibilidade é errática quando administrado na forma de cápsulas por via oral. Recomenda-se, por isso, seu monitoramento terapêutico. De forma semelhante ao cetoconazol, este fármaco necessita da acidez gástrica e refeições ricas em lipídios para máxima absorção.⁷ Assim, estratégias que visem a redução das reações adversas e atuem solucionando o problema na biodisponibilidade são fundamentais. Neste sentido foram desenvolvidas formulações estruturadas com este fármaco. O itraconazol vem sendo comercializado, em duas formulações nanoestruturadas: uma para utilização por via intravenosa e outra, para via oral (Sporanox[®]), nos Estados Unidos e em outros países que não o Brasil. Entretanto, a formulação intravenosa tem como contra-indicação seu uso em pacientes com comprometimento renal, além de causar ataxia e esplenomegalia. A solução oral, por sua vez, tem relatada como reação adversa a diarreia. Isso é decorrente do sistema nanoestruturado utilizado, a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, à qual está associada à toxicidade e aos efeitos adversos.¹⁰ Assim, muitos estudos vem sendo realizados na área nanotecnologia com este fármaco, com o intuito de melhorar a eficácia, mas, sobretudo, de aumentar a segurança de formulações com este fármaco.¹⁸⁻²⁰ Entretanto, foram encontrados apenas dois trabalhos na literatura que fabricaram nanoemulsões de itraconazol para uso parenteral,^{20,21} mas com matérias-primas distintas das por nós utilizadas. Nanoemulsões são formulações obtidas pela dispersão de duas fases líquidas imiscíveis ou praticamente imiscíveis com auxílio de um sistema emulsionante adequado, com tamanho de gotícula na faixa de 50 a 500 nm. Geralmente apresentam aspecto leitoso e são compatíveis com o calibre dos vasos sanguíneos.^{11,12} Dentre as técnicas empregadas para o preparo destas preparações

farmacêuticas está a homogeneização à alta pressão. Esta técnica possui como vantagens o fato de ser um método físico em que se obtém de emulsões monodispersas, além da facilidade de escalonamento, pelo fato de haver uma grande gama de equipamentos com diferentes capacidades de produção.¹¹ Deste modo, nanoemulsão produzida por esta técnica apresentou características satisfatórias para uma nanoemulsão de uso parenteral.

A avaliação da atividade antifúngica de nanossistemas contendo itraconazol é rara na literatura. Nanoemulsões de itraconazol nunca foram avaliadas quanto à sua atividade por métodos *in vitro*. Nanopartículas poliméricas de itraconazol compostas por ácido dimercaptosuccínico e poli (DL-lactídeo-co-glicolídeo) foram avaliadas quanto à sua atividade *in vitro* contra uma cepa de *Paracoccidioides brasiliensis*. Logo após o preparo, as nanocápsulas apresentaram CIM de 6,25 mg/L, enquanto para o itraconazol foi de 0,4 mg/L. Entretanto, após 60 dias de estocagem as nanopartículas apresentaram a mesma CIM que o fármaco livre. Apesar de inicialmente se ter uma taxa de encapsulação de aproximadamente 73%, os autores atribuem este aumento na atividade à degradação do polímero ao longo do tempo, deixando o fármaco disponível para atuar.²² Apesar de termos obtidos uma taxa de associação superior, foi possível obter CIM semelhantes aos fármaco livre para os diferentes agentes da cromoblastomicose testados. Em outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa foi possível verificar que a associação a um determinado veículo é fármaco-dependente, ou seja, utilizando um mesmo veículo e fármacos distintos, é possível visualizar diferentes taxas de liberação, que pode ser medida pela atividade antifúngica encontrada.²³

No modelo *in vivo*, não foi possível obter as formas escleróticas, características da cromoblastomicose. Entretanto, o ensaio mostrou-se válido por

podermos avaliar a atividade da nanoemulsão de itraconazol em comparação com o fármaco livre, bem como por podermos avaliar os efeitos destes tratamentos em um organismo complexo. Neste ensaio utilizamos uma dose correntemente empregada no tratamento da cromoblastomicose, correspondente a 200 mg/dia para um indivíduo adulto de 70 Kg. Obtivemos um número inferior de colônias quando os animais foram tratados com a nanoemulsão. Isso pode ser atribuído à composição de óleos utilizada no fabrico da nanoemulsão, os quais possuem atividades antiinflamatórias. É conhecido que antiinflamatórios não esteroidais atuam inibindo a formação de hifas em *Candida albicans* e por isso poderiam atuar potencializando efeitos dos antifúngicos.²⁴⁻²⁶

Para as formulações comerciais nanoestruturadas disponíveis é relatada toxicidade renal em função do nanocarreador.¹⁰ Esta toxicidade não foi encontrada com a nanoemulsão por nós produzida, confirmada tanto através das análises histopatológicas quanto por exames bioquímicos. Com relação à análise dos fígados foi observada uma proteção hepática nos animais que receberam a nanoemulsão, quando comparados com os animais que receberam o itraconazol livre, o que foi corroborado pelos níveis de alanina aminotransferase, os quais foram inferiores no primeiro grupo. Deste modo, conseguimos reduzir o principal efeito adverso associado ao itraconazol, a hepatotoxicidade.

As avaliações toxicológicas *in vitro* são mais econômicas e mais rápidas do que experimentos *in vivo*. Além disso, são mais vantajosas e éticas do que testes em animais.^{13,27} A simplificação dos modelos *in vitro* permite a seleção dos parâmetros a serem avaliados, havendo deste modo, uma maior facilidade em desvendar mecanismos causais. Por isso, os estudos *in vitro* representam uma primeira investigação o para a compreensão dos mecanismos que resultam em

interações entre a célula e o nanossistema, antes de serem utilizados ensaios *in vivo*.

¹³ Através destes ensaios foi possível verificar que o itraconazol livre apresentou citotoxicidade a partir de 0,41 µg/mL enquanto que a concentração de 4,915 µg/mL de itraconazol na nanoemulsão não foi citotóxica contra a linhagem celular avaliada. Nanossistemas lipídicos não são normalmente avaliados com relação à toxicidade, pelo fato das matérias-primas empregadas serem biocompatíveis. ¹⁶ Neste sentido este trabalho está contribuindo para a elucidação de uma questão pouco explorada.

Assim, a nanoemulsão de itraconazol produzida mostrou atividade satisfatória contra agentes da cromoblastomicose tanto *in vitro* como *in vivo* e reduziu a hepatotoxicidade provocada pelo itraconazol. Além disso, não foi citotóxica por si só e reduziu os efeitos citotóxicos associados ao fármaco. Neste sentido, a nanoemulsão de itraconazol estaria apta a ser uma alternativa terapêutica segura e eficaz para o manejo da cromoblastomicose.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). CNPq Processo n^o 482635/2010-0 e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Declarações de Transparência

Nada a declarar

Referências

1. Torres-Guerrero E, Isa-Isa R, Isa M *et al.* Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol* 2012; **30**: 403–08.

2. Martínez RL, Tovar LJM. Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol* 2007; **25**: 188-94.
3. McGinnis MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. *J Am Acad Dermatol* 1983; **8**: 1-16.
4. Esterre P, Queiroz-Telles F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Curr Opin Infect Dis* 2006;**19**:148-52.
5. Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 2003; **11**: 272-9.
6. Somchit N, Norshahida AR, Hasiah AH *et al.* Hepatotoxicity induced by antifungal drugs itraconazole and fluconazole in rats: a comparative in vivo study. *Hum Exp Toxicol* 2004; **23**: 519 – 25.
7. Wu JJ, Pang KR, Huang DB, Tying SK. Therapy of systemic fungal infections. *Dermatol Ther* 2004; **17**: 532–8.
8. Barone JA, Moskovitz BL, Guarnieri J *et al.* Enhanced bioavailability of itraconazole in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin solution versus capsules in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemoth* 1998; **42**:1862–5.
9. Slain D, Rogers PD, Cleary JD, Champman SW. Intravenous itraconazole. *Ann Pharmacother* 2001; **35**:720–9.
10. Mouton JW, Van Peer A, De Beule K *et al.* Pharmacokinetics of Itraconazole and Hydroxyitraconazole in Healthy Subjects after Single and Multiple Doses of a Novel Formulation. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50(12)**: 4096–102.
11. Almeida ME, Teixeira HF, Koester LS. Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na atualidade. *Lat Am J Pharm* 2008; **27 (5)**: 780-8.

12. Formariz TP, Urban MCC, Silva Júnior AA *et al.* Microemulsão e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Braz J Pharm Sci* 2005; **41**: 301-13.
13. Bimbo LM, Peltonen L, Hirvonen L *et al.* Toxicological Profile of Therapeutic Nanodelivery Systems. *Curr Drug Metab* 2012; **13**: 1068-86.
14. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect* 2005; **113**: 823-39.
15. Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A *et al.* Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol* 2007; **150(5)**: 552-8.
16. Souto EB, Martins-Lopes P, Lopes CM *et al.* A Note on Regulatory Concerns and Toxicity Assessment in Lipid-Based Delivery Systems (LDS). *J Biomed Nanotechnol* 2009; **5**: 317-22.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2008 Approved Standard M38-A2.
18. Vaughn JM, McConville JT, Burgess DS *et al.* Single dose and multiple dose studies of itraconazole nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; **63**: 95–102.
19. Rabinow B, Kipp J, Papadopoulos P *et al.* Itraconazole IV nanosuspension enhances efficacy through altered pharmacokinetics in the rat. *Int J Pharm* 2007; **339**: 251–60.
20. Akkar A, Muller HR. Intravenous itraconazole emulsions produced by SolEmuls technology. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; **56**: 29-36.

21. Rhee YS, Park CW, Nam TY *et al.* Formulation of parenteral microemulsion containing itraconazole. *Arch Pharm Res* 2007; **30**: 114-23.
22. Cunha-Azevedo EP, Silva JR, Martins OP *et al.* *In Vitro* Antifungal Activity and Toxicity of Itraconazole in DMSA-PLGA Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2010; **10**: 1–7.
23. Daboit TC, Machado MS, Magagnin CM *et al.* Nanoemulsão de anfotericina B: avaliação da atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* em agentes da cromoblastomicose. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, no prelo.
24. Alem MA, Douglas LJ. Prostaglandin production during growth of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol* 2005; **54**: 1001–5.
25. Erb-Downward JR, Noverr MC. 2007. Characterization of prostaglandin E2 production by *Candida albicans*. *Infect Immun* 2007; **75**: 3498–505.
26. Bink A, Kucharíková S, Neirinck B *et al.* The nonsteroidal antiinflammatory drug diclofenac potentiates the *in vivo* activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *J Infect Dis* 2012; **206**:1790–7.
27. Kunzmann A, Andersson B, Thurnherr T, Krug H, Scheynius A, Fadeel B. Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1810**: 361-73.

Tabela 1. Avaliação da atividade antifúngica de itraconazol e nanoemulsão de itraconazol em agentes da cromoblastomicose. Valores expressos em média geométrica das CIM (mg/L).

	Itraconazol	Nanoemulsão de itraconazol
<i>Cladophialophora carrionii</i> (n=6)	0,0884	0,0992
<i>Fonsecaea</i> spp. (n=44)	0,1660	0,1396
<i>Phialophora verrucosa</i> (n=6)	0,1768	0,1768
<i>Rhinoctadiella aquaspersa</i> (n=2)	0,25	0,25
<i>Exophiala spinifera</i> (n=2)	0,25	0,25

Tabela 2. Contagem de colônias obtidas após inoculação da pata do camundongo em Agar Sabouraud acrescido de cloranfenicol, para os diferentes tratamentos avaliados.

	Itraconazol Livre	Nanoemulsão Itraconazol	Nanoemulsão Branca	Água Glicosada	Controle
Nº Colônias (média)	1,89	0,78	4,88	4,71	4,88
Desvio Padrão	1,54	1,09	3,14	2,87	3,26

Tabela 3: Níveis da enzima Alanina aminotransferase para os diferentes tratamentos pelo método UV cinético. (Valores expressos em U/L de sangue).

	Itraconazol Livre	Nanoemulsão Itraconazol	Nanoemulsão Branca	Água Glicosada	Controle
Alanina amino-transferase	42,78	36,33	33,63	34,57	31,56
Desvio Padrão	2,23	1,73	1,41	1,90	1,81

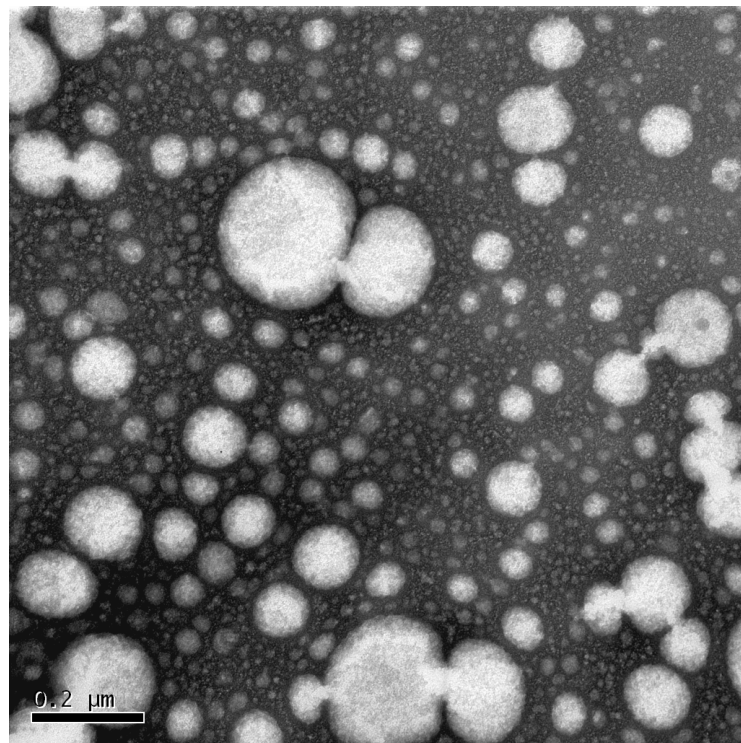


Figura 1. Microscopia eletrônica de transmissão da Nanoemulsão de Itraconazol (100k).

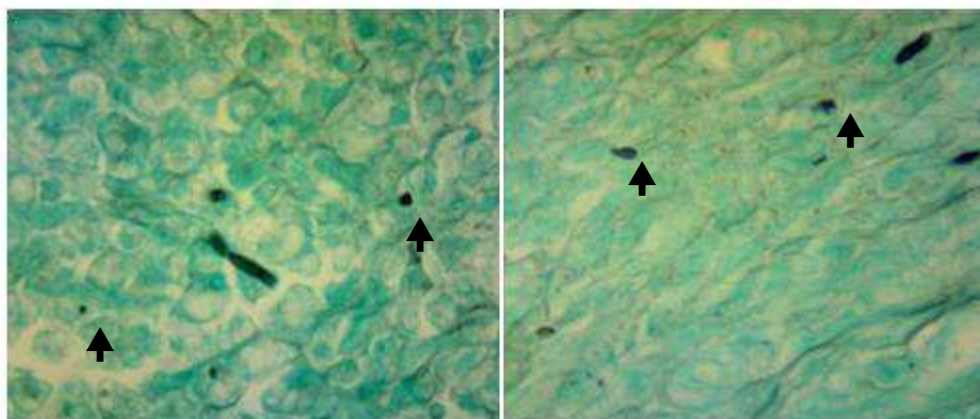


Figura 2. Cortes histológicos das patas de camundongos Balb/C machos após 15 dias da inoculação. Presença majoritária de esporos. Coloração Grocott - 100x

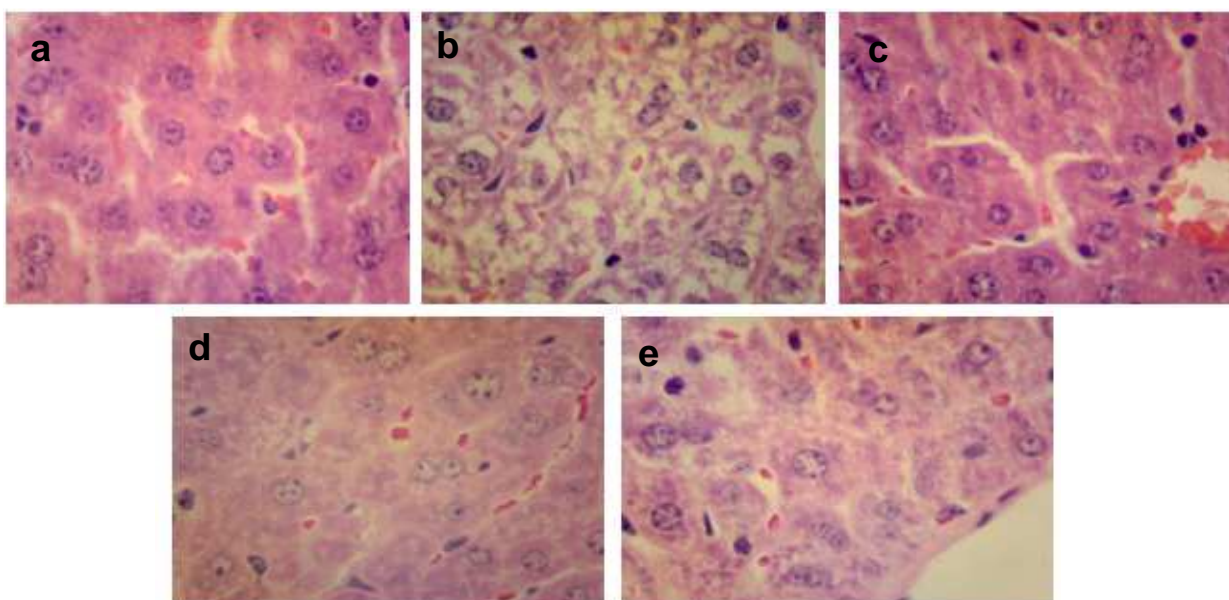


Figura 4. Análise histopatológica do fígado nos diferentes tratamentos: (a) Controle, (b) Água Glicosada, (c) Nanoemulsão Branca, (d) Itraconazol, (e) Nanoemulsão de Itraconazol. Coloração H&E – 40x.

Capítulo III: A case of *Exophiala spinifera* infection in Southern Brazil:
molecular identification and antifungal susceptibility.

Artigo Publicado na Revista Medical Mycology Case Reports 2012; 1: 72-5.

Capa da Revista Medical Mycology 2012; 50(8)

A case of *Exophiala spinifera* infection in Southern Brazil: molecular identification and antifungal susceptibility.

Tatiane Caroline Daboit 1^{a,b}, Rodrigo Pereira Duquia 2^c, Cibele Massotti Magagnin 3^{a,b}, Sandra Denise Camargo Mendes 4^a, Mauricio Ramírez Castrillón 5^a, Raquel Steglich 6^c, Inajara Silveira dos Santos 7^c, Gerson Vettorato 8^c, Patrícia Valente 9^a and *Maria Lúcia Scroferneker 10^{a,b}.

^a *Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar, Porto Alegre, CEP: 90035-003, Brazil.*

^b *Department of Microbiology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500, Sala 210, Porto Alegre, CEP: 90050-170, Brazil.*

^c *Dermatology Service, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre Hospital Complex. Rua Prof. Annes Dias, 285, Porto Alegre, CEP: 90020-090, Brazil.*

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article history:

Received

Received in revised form

Accepted

Available online

*Keywords:*Keyword_1 *Exophiala spinifera*

Keyword_2 phaeohyphomycosis

Keyword_3 ITS rDNA

Keyword_4 *in vitro* antifungal
susceptibilityKeyword_5 checkerboard
technique

We report a case of an 80-year-old Brazilian man, farmer, with lesions on the dorsum of the hand. A direct mycological examination, cultivation and microculture slide observation was performed. The sequencing of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region was carried out and the etiological agent confirmed as *Exophiala spinifera*. The *in vitro* susceptibility of this isolate to antifungal agents alone and in combination was evaluated. This is the third case of phaeohyphomycosis caused by *Exophiala spinifera* in Brazil. 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Exophiala spinifera is a dematiaceous fungus, with cosmopolitan distribution, but of rare occurrence, which can cause phaeohyphomycosis and chromoblastomycosis. Most of these infections are cutaneous and subcutaneous, but systemic infections are also reported [1-4].

The treatment is not well defined, and it is usually carried out empirically [5].

Microorganisms of the genus *Exophiala* are commonly found in the environment in plant materials, wood and soil [6]. The infection into cutaneous and subcutaneous tissues typically occurs by traumatic inoculation of fungal propagules, while systemic cases do not have well-defined portals of entry [7].

The first case of phaeohyphomycosis by *Exophiala spinifera* in Brazil was reported in 1984 by Lacaz et al. [8], where the mycosis was presented in a disseminated form. This case occurred in Midwestern Brazil. The second case occurred in the northeast of the country, where the lesions were in the form of subcutaneous abscesses involving skin, muscle and bone degeneration [9]. Here we report the third case of phaeohyphomycosis caused by *Exophiala spinifera* in Brazil, the first in the South of the country and the first Brazilian case with molecular identification of the etiologic agent.

2. Case

JAZ, male, farmer, 80 years, Brazilian, lives in rural area of Nova Santa Rita, Rio Grande do Sul, Brazil. Four years ago, small cutaneous lesions on the dorsum of his hand began to appear, which evolved slowly and drained secretion. He was admitted to a hospital in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, in August 2011, being treated twice with antibiotics for cutaneous cellulitis with little response. After 14 days, with the second antibiotic, the patient showed improvement in 30 percent of the lesions, clinical stabilization and was discharged. Soon after, he was sent to a dermatologist for evaluation. In the first consultation, the patient showed a severe edema of the arm and hand with pseudo skin fistulae, draining serous material upon compression (Fig.

1a). The clinical aspect of the lesion was of a mycetoma. The patient was sent to the Dermatology Service of Santa Casa de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, for the execution of direct microscopic examination and cultural test. Initially, the collected material was treated with 20% potassium hydroxide and the presence of fragments of moniliform dematiaceous hyphae was verified (Fig.1b), while the presence of melanin was observed after Masson-Fontana staining (Fig. 1c), indicating a phaeohyphomycosis. Treatment was started with itraconazole at 100mg, 12-12 hours. After 1 month of treatment, the patient had already more than 60 percent improvement in lesion. The patient continued with itraconazole and is currently cured.



Fig. 1 (a) Lesions caused by *Exophiala spinifera* (74110) in the patient's hand and arm. (b) Direct microscopic examination (KOH 20%) of material collected from the lesions revealed fragments of moniliform dematiaceous hyphae (40 X). (c) Direct microscopic examination using Masson-Fontana staining (40 X)

Mycology

Some of the material collected from the lesions was inoculated on Sabouraud Dextrose agar and incubated for 15 days at 25 °C (Fig. 2b). The growth of yeast-like, olivaceous black colonies with black pigmentation on the reverse side was verified. Microscopic study using slide culture techniques with Potato Dextrose Agar was

conducted to induce sporulation. In this evaluation, straight, long, spine-like, brownish and septate conidiophores were observed. The conidia were obovoid and located at the apices of conidiogenous cells, as well as at intercalary places (Fig. 2a). Based on the morphological characteristics, the isolate was classified as an *Exophiala* species. This clinical isolate was inserted into the culture collection of pathogenic fungi laboratory of the Federal University of Rio Grande do Sul as 74110.



Fig.2 *Exophiala spinifera* (74110) (a) Slide culture techniques with Potato Dextrose agar, where straight, long, spine-like, brownish and septate conidiophores were observed. The obovoid conidia were located at the apices of conidiogenous cells, as well as at intercalary places. (b) Culture of the clinical isolate in Sabouraud Dextrose agar, where it had a yeast-like growth with olivaceous black colonies

Molecular Identification

For the molecular identification, the strain 74110 was grown aerobically in Sabouraud broth at 28°C, with shaking at 180 r.p.m., until growth attained mid-log phase. Total genomic DNA was extracted and purified from 100mL cultures using the UltraClean® Soil DNA Isolation Kit (Mobio, USA). Sequencing of the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region was performed using the Universal primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') [10]. The amplification conditions were: initial denaturation at 94°C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 30 s, extension at 72°C for 1 min, and final extension at 72°C for 10 min. The PCR product was purified by the Ultraclean® PCR Clean-Up Kit (Mobio, USA), and sequenced at the Biotechnology Center of Federal University of Rio Grande do Sul (Cbiot/UFRGS), Brazil. The sequence was assembled and compared with sequences reported in GenBank using the basic local alignment search tool (BLAST) algorithm. Through this technique, the etiologic agent was confirmed as *Exophiala spinifera*, since it had 99% sequence identity with the type strain of this species (CBS 899.68).

In vitro antifungal susceptibility evaluation

The *in vitro* sensitivity to antifungal agents of *Exophiala spinifera* 74110 was determined by the broth microdilution methodology, according to the M38-A2 document of the Clinical and Laboratory Standards Institute [11]. The clinical isolate was subcultured onto potato dextrose agar (PDA; Difco) at 35°C for 10 days. The spore suspension was produced by adding sterile saline solution (0,9%) and slightly scraping the surface of colonies with a sterile pipette. The homogeneous conidial

suspension was transferred to sterile tube and the supernatants were adjusted on a spectrophotometer at 530 nm until to an optical density (OD) that ranged from 0.09–0.13 (80– 82 T%). The inoculum was prepared by dilution in RPMI 1640 medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) with L-glutamine, without sodium bicarbonate buffered to pH 7.0 with 165 mM morpholinepropanesulfonic acid (MOPS;Sigma) until a final concentration of $0.4 \times 10^4 - 5 \times 10^4$ CFU/mL. After 5 days of incubation at 35 °C, the MIC was determined visually by comparison with the drug-free growth control well. *Candida krusei* ATCC 6258 was used as quality control. The antifungal agents assessed were amphotericin B, itraconazole, ketoconazole, terbinafine and voriconazole, at concentrations between 0.003 and 4 µg/mL for terbinafine and 0.03 and 16 µg/mL for amphotericin B, itraconazole, ketoconazole and voriconazole. Were included in these trials, besides a microorganism-free control (sterile), an antifungal-free control (growth control). The isolate was susceptible to itraconazole and ketoconazole, with minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.25 µg/mL and 0.50 µg/mL, respectively, followed by terbinafine with an MIC 2 µg/mL, by amphotericin B with an MIC 4 µg/mL and by voriconazole with an MIC 8 µg/mL.

In parallel, an evaluation of antifungal agent combinations with the checkerboard technique [12] was carried out. The concentration ranges of the antifungal used are the same above mentioned. The interaction coefficient among drugs was quantitatively evaluated by means of the fractional inhibitory concentration index (FIC), which was calculated by the following formula: $FIC = (MIC\ A\ in\ combination / MIC\ A) + (MIC\ B\ in\ combination / MIC\ B)$. The interaction was defined as synergistic if the FIC index was ≤ 0.5 , no interaction if $0.5 > FIC \leq 4.0$, and antagonistic if FIC was > 4.0 . The associations of itraconazole and voriconazole (FCI = 0.49), and of

terbinafine and voriconazole (FCI = 0.375) proved to be synergistic. The other associations were indifferent.

3. Discussion

Exophiala spinifera is an unusual causative agent of infection both in humans and in animals [5, 13]. Until recently the identification of these agents was only based on macroscopic and microscopic aspects of the culture. Because of this, it is believed that the number of cases is underestimated by the morphological similarity between the species of the genus *Exophiala* [4, 14].

There was a significant expansion in the knowledge about this genus with the advent of techniques of sequencing and the analysis of sequence data of the ribosomal DNA (rDNA) Internal Transcribed Spacer (ITS) regions [14,15]. Our case report is the fourth in the literature using molecular tools for identification of this fungus. The use of these methodologies is of utmost importance in the clinic, because among the different species there may be different patterns of susceptibility to antifungal agents [15].

Many drugs are used to treat infections caused by *E. spinifera*, such as itraconazole, posaconazole, voriconazole, ketoconazole, fluconazole, terbinafine, amphotericin B, 5-flucytosine, and physical treatments such as cryosurgery, heat therapy and surgical excision [1 -5, 8, 9, 16-18]. However, there is currently no standard antifungal therapy for black fungi and little is known about the correlation between MICs obtained in tests *in vitro* and *in vivo* efficacy [18]. In our case, we can correlate the *in vitro* susceptibility and clinical response, in which the itraconazole showed a lower MIC and was effective against lesions caused by *E. spinifera*.

Itraconazole has proven to be the most efficient drug in the treatment of this fungus [4, 16,17]. The literature reports that itraconazole requires low pH for its proper absorption. In the elderly, there may be a reduction in the production of gastric juice, which decreases the bioavailability of the drug, thus compromising its activity [19]. Our patient, despite his advanced age, showed excellent response to this antifungal.

Some studies have reported resistance of *E. spinifera* to itraconazole [2, 3, 5]. In this regard the use of combinations of antifungal agents in cases where there is no response to the antifungal used alone or in severe cases could be an alternative to increasing the efficacy of each drug and to obtain efficacy using lower doses [20]. In our study, combinations of antifungals were evaluated, in which we found that voriconazole, drug that was less active when used alone, showed synergism when combined with terbinafine and itraconazole, and in case of resistance, these combinations could have been used. At the clinic it has been observed that the association of the drugs is positive for the treatment of this etiologic agent [1].

Infections caused by this black fungi are more common in disseminated form in children, and cutaneous and subcutaneous forms in adults [9, 4, 18], pattern that is kept in our case.

Since the patient is a farmer and the fact that *E. spinifera* is present in the environment [6], it is probable that the patient has been infected at work, although he did not relate trauma injuries.

In Brazil, there were two other reported cases of infection caused by *E. spinifera* [8,9]. In both, the patients were children (5 - 12 years old) and amphotericin B was used, resulting in no clinical improvement with this drug. The first case was a

disseminated phaeohyphomycosis, affecting various points throughout the extension outside of the body. The patient had a brain tumor, which was not biopsied, but was probably the source of infection. The patient was lost to follow-up. The second case reported a phaeohyphomycosis with abscesses that affected first the right side of the face. After one year, the lesions were also present on the fingers, elbow and left toe. Over time the abscesses suffered ulceration. By X-rays it was found degradation of the bone in the affected fingers. The patient died. The case reported by us is quite different from the other cases that occurred in Brazil, since the patient was an adult, with only localized cutaneous lesions and responsive to medication.

Based on our case, we can claim to be of extreme importance the molecular identification of the causative agents of phaeohyphomycosis for correct identification, as well as the evaluation of *in vitro* antifungal activity of the clinical isolate, as tools that can guide the clinical practice.

4. Acknowledgements

The authors want to thank the CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the financial support and scholarships. CNPq Process nº 482635/2010-0.

5. Conflict of Interest

There are none.

6. References

- [1] Padhye AA, Kaplan W, Neuman MA, Case P, Radcliffe GN. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala spinifera*. Sabouraudia. 1984; 22: 493-00.
- [2] Padhye AA, Hampton AA, Hampton MT, Hutton NW, Prevost-Smith E, Davis MS. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. Clin Infect Dis. 1996; 22: 331 – 5.
- [3] Negroni R, Helou SH, Petri N, Robles AM, Arechavala A, Bianchi MH. Case study: posaconazole treatment of disseminated phaeohyphomycosis due to *Exophiala spinifera*. Clin Infect Dis. 2004; 38: e15 – 20.
- [4] Harris JE, Sutton DA, Rubin A, Wickes B, De Hoog GS, Kovarik C. *Exophiala spinifera* as a cause of cutaneous phaeohyphomycosis: case study and review of the literature. Med Mycol. 2009; 47: 87 – 93.
- [5] Singal A, Pandhi D, Bhattacharya SN, Das S, Aggarwal S, Mishra K. Pheohyphomycosis caused by *Exophiala spinifera*: a rare occurrence. Int J Dermatol. 2008; 47: 44–7.
- [6] Conti-Dìaz I, MacKinnon JE, Civila E. Isolation and identification of black yeasts from the external environment in Uruguay. Pan Am Health Org Sci Publ. 1977; 356: 109–14.
- [7] Brandt ME, Warnock DW. Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. J Chemother. 2003; 15: 36-47.
- [8] Lacaz CS, Porto E, Andrade JG, Queiroz Telles, F. Feohifomicose disseminada por *Exophiala spinifera*. An Bras Dermatol. 1984; 59: 238-43.
- [9] Campos-Takaki GM, Lobo Jardim M. Report of chronic subcutaneous abscesses

- caused by *Exophiala spinifera*. Mycopathologia. 1994; 127: 73-6.
- [10] White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In : Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J, editors. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press Incorporation; 1990, p. 315-322.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard M38-A2. 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2008.
- [12] Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? Antimicrob Agents Chemother. 2004; 54: 854-69.
- [13] Kettlewell P, Mcginnis MR, Wilkinson GT. Phaeohyphomycosis caused by *Exophiala spinifera* in two cats. J Med Vet Mycol. 1989; 27: 257-64.
- [14] De Hoog GS, Vicente V, Caligiorne RB, Kantarcioglu S, Tintelnot K, Gerris van den Ende AHG, et al. Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. J Clin Microbiol. 2003; 41: 4767–78.
- [15] Vitale RG, De Hoog GS. Molecular diversity, new species and antifungal susceptibilities in the *Exophiala spinifera* clade. Med Mycol. 2002; 40: 545 - 56.
- [16] Rajendran C, Khaitan BK, Mittal R, Ramam M, Bhardwajw M, Data KK. Phaeohyphomycosis caused by *Exophiala spinifera* in India. Med Mycol. 2003; 41: 437-41.
- [17] Takahara M, Imafuku S, Matsuda T, Uenotsuchi T, Matsumoto T, Padhye AA, Furue M. Concurrent double infections of the skin: Phaeohyphomycosis and nocardiosis in a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura. J Am Acad Dermatol. 2005; 53: S277-80.

- [18] Badali H, Chander J, Bayat M, Seyedmousavi S, Sidhu S, Rani H, et al. Multiple subcutaneous cysts due to *Exophiala spinifera* in an immunocompetent patient. *Med Mycol.* 2012; 50: 207–13.
- [19] Hof, H. Mycoses in the elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29: 5–13.
- [20] Yu J, Ruoyu L, Zhang M, Liu L, Wan Z. *In vitro* interactions of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblastomycosis in China. *Med Mycol.* 2008; 46: 745–7.

Capítulo IV: A case of relapsed chromoblastomycosis due to
Fonsecaea monophora: antifungal susceptibility and phylogenetic analysis.

Artigo Aceito pela Revista Mycopathologia – Anexo 1.

**A case of relapsed chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora*:
antifungal susceptibility and phylogenetic analysis.**

Tatiane Caroline Daboit, Cibele Massotti Magagnin, Daiane Heidrich, Mauricio Ramírez Castrillón, Sandra Denise Camargo Mendes, Gerson Vettorato, Patrícia Valente, Maria Lúcia Scroferneker

T. C. Daboit · C. M. Magagnin · D. Heidrich · M. L. Scroferneker.

Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP: 90035-003.

T. C. Daboit* · C. M. Magagnin · D. Heidrich · M. Ramírez Castrillón · S.D.C. Mendes · P. Valente · M. L. Scroferneker*

Department of Microbiology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500, Sala 210, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP: 90050-170. E-mail: tatidaboit@gmail.com / scrofern@ufrgs.br

G. Vettorato

Dermatology Service, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre Hospital Complex. Rua Prof. Annes Dias, 285, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP: 90020-090.

Correspondence:

T. C. Daboit and M.L. Scroferneker. Rua Sarmiento Leite, 500, Sala 210, Porto Alegre, CEP: 90050-170, Brazil. Tel.: +55 51 3308 3934. Fax: +55 51 3308 3121e-mail: tatidaboit@gmail.com / scrofern@ufrgs.br

Abstract

Chromoblastomycosis is a chronic cutaneous and subcutaneous mycosis. The management of this infection continues to be challenging because there is no consensus on the therapeutic regimen. We report here a case of a 69-year-old male patient with cauliflower-like lesions on his left leg and foot. He had already been treated with itraconazole at a dose of 200mg/day for 5 months, with mycological cure of all the affected areas. However, the lesions relapsed at both sites, and treatment with itraconazole was resumed at the dose previously used. Initially, direct mycological examination, cultural and microculture slide observation were performed. Afterwards, sequencing of the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region of the fungal DNA and evaluation of its susceptibility to antifungal agents alone and in combination were performed. In direct mycological examination the presence of sclerotic cells was verified, and the fungus was identified as *Fonsecaea* based on cultural and microscopic examinations. Identification as *Fonsecaea monophora* was confirmed after sequencing of the ITS region and phylogenetic analysis. The isolate was susceptible to itraconazole and terbinafine. The combinations of amphotericin B and terbinafine and terbinafine and voriconazole were synergistic. The use of drugs for which the causative agent is susceptible to singly or in combination may be an alternative for the treatment of mycosis. Furthermore, the identification of the agent by molecular techniques is important for epidemiological purposes. To the best of our knowledge, this is the first case of relapsed chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea monophora* in Brazil.

Keywords: checkerboard technique, chromoblastomycosis, *Fonsecaea monophora*, *in vitro* antifungal susceptibility, ITS rDNA, recurrence.

Introduction

Chromoblastomycosis is a chronic mycosis of polymorphic appearance, slowly progressing, that affects the skin and subcutaneous tissue. It is caused by several species of dematiaceous fungi, such as *Fonsecaea* spp. [1-3]. This mycosis has a cosmopolitan distribution, being mostly prevalent in tropical and subtropical regions [4]. Recently, different species within the *Fonsecaea* genus were described [5-7]. *F. monophora*, one of the species, has a distinctive clinical aspect in relation to other species, appearing as a general opportunist fungus causing, besides cutaneous and subcutaneous chromoblastomycosis, infections in internal organs, such as the brain [8-9]. Furthermore, it is reported that this agent has a better response to treatment compared to *F. pedrosoi* [9-11], although recently resistance was verified in a case of chromoblastomycosis caused by *F. monophora* [12]. Relapse of the infection caused by this fungus is rarely reported in the literature [13] and, to the best of our knowledge, this is the first case of relapsing chromoblastomycosis by *F. monophora* in Brazil.

Therefore, we report a case of chromoblastomycosis caused by *F. monophora* in Brazil where mycological cure was initially achieved with itraconazole, but the lesions relapsed later. The clinical isolate after the relapse was identified molecularly and evaluated for its susceptibility to drugs currently used in the clinic, both singly and in combination.

Case Report

A male 69-year old patient, Brazilian, farmer, presenting lesions in his left leg and foot with a diagnosis of chromoblastomycosis was sent from a Health Unit of the city

of São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brazil, to the Dermatology Department at Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre Hospital Complex, in the same State, in January 2011. Prior to referral to the Hospital Complex, the patient had already been treated with 200mg/day itraconazole for 5 months, showing mycological cure of all the affected sites. In 2010, there was a recurrence of the lesions, and the treatment with 200 mg/day itraconazole was retaken. At the Dermatology Service, the patient denied comorbidities, except for the deformation in the foot. He presented edema in the left foot and leg, verrucous lesions, and papules on the dorsum of the foot and heel (Fig. 1a and 1b). For confirmation of the diagnosis, a mycological direct exam was carried out, with 20% potassium hydroxide, and the presence of sclerotic cells was verified (Fig. 1c). After confirmation of the presence of fungal material, a sample was inoculated on Sabouraud agar and incubated for 10 days at 25 °C. Following incubation, the presence of dark-olivaceous filamentous colonies was observed (Fig. 2b). The culture was observed microscopically with lactophenol cotton blue staining. Dematiaceous septate hyphae and conidiogenesis were characteristic of the *Fonsecaea* species (brown conidiophores and ovoid conidia located either at the end or at the side of conidiophores) (Fig. 2a). The treatment with itraconazole in the dosage mentioned above was maintained, with significant regression of lesions after one month, and the patient was lost to follow-up.

The molecular identification of the isolate was performed from the culture grown aerobically in Sabouraud broth at 28°C, with shaking at 180 r.p.m. for 4 days. Total genomic DNA was extracted and purified from 100 mL cultures using the UltraClean® Soil DNA Isolation Kit (Mobio, USA). The Internal Transcribed Spacer (ITS) region was PCR amplified as described previously [14]. The PCR product was purified by

the UltraClean[®] PCR Clean-Up Kit (Mobio,USA). Cycle sequencing employed standard protocols with the following primers: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') and ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Sequences were obtained with an ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Alignments and phylogenetic trees were constructed with MEGA 5 [15], using the neighbor joining method with bootstrap analysis based on 1,000 random samplings. Gaps were treated as missing data. Additional sequences were retrieved from GenBank (accession numbers are indicated on the phylogenetic tree). The isolate was identified as *F. monophora* after the phylogenetic analysis (Fig. 3). This strain was added into the culture collection of pathogenic fungi laboratory of the Federal University of Rio Grande do Sul as 69704.

As there has been a relapse after the first treatment with itraconazole, we made a proper assessment of the susceptibility profile of this isolate to the antifungal agents employed either individually or in combination.

The antifungal susceptibility evaluation was performed according to the M38-A2 document of the *Clinical and Laboratory Standards Institute* [16], and, in parallel, an evaluation of combinations of the antifungal agents through the checkerboard technique [17] was carried out. The interaction coefficient among drugs was quantitatively evaluated by means of the fractional inhibitory concentration index (FICI), which was calculated by the following formula: $FICI = (MIC\ A\ in\ combination / MIC\ A) + (MIC\ B\ in\ combination / MIC\ B)$. The interaction was defined as synergistic if the FIC index was ≤ 0.5 , no interaction if $0.5 > FICI \leq 4.0$, and antagonistic if FICI was > 4.0 , as applied in recent studies [18-20]. The antifungals itraconazole (ITZ), voriconazole (VRZ), terbinafine (TRB) and amphotericin B (AMB) were used in the concentration ranges of 0.015 to 8 $\mu\text{g/mL}$ for the first two, 0.001 to 2 $\mu\text{g/mL}$ for TRB

and 0.03 to 16 µg/mL for AMB. The isolate was susceptible to ITZ and to TRB, with minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.125 µg/mL, followed by VRZ with MIC of 1 µg/mL and by AMB, with a MIC of 2 µg/mL. In relation to the combinations, the associations of TRB and AMB (FICI = 0.27) and of TRB and VRZ (FICI = 0.37) proved to be synergistic, and the first combination showed greater synergism, with a decrease in the antifungal MICs in combination when compared to the MICs of the drugs alone. The other associations were indifferent.

Discussion

Fonsecaea spp. are the major etiologic chromoblastomycosis agents in Brazil and worldwide [3]. Among the most commonly used methodologies for molecular identification of agents of chromoblastomycosis are the techniques of sequencing and the analysis of sequence data of the ribosomal DNA (rDNA) Internal Transcribed Spacer (ITS) regions [15, 21-22]. With these techniques, there was a significant increase in knowledge concerning the genus *Fonsecaea*.

There was a recent taxonomic revision of this genus [5-7, 23] and from data obtained by sequencing, five species are currently recognized: *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica*, *F. multimorphosa* and *F. brasiliensis*. The first three species were found to cause fungal infections in humans. These species are morphologically identical, but appear distinctly in the clinic. Whereas *F. pedrosoi* and *F. nubica* seem to be associated exclusively with chromoblastomycosis, *F. monophora* was also isolated from brain abscesses, cervical lymph nodes and bile [8, 13, 24].

The phylogenetic analysis of the ITS sequences demonstrates that *F. pedrosoi* and *F. monophora* form a sister cluster to *F. nubica*, and are more distantly related to *F. multimorphosa* and *F. brasiliensis* (Fig. 3). As several sequences deposited in GenBank as *F. pedrosoi* belong in fact to *F. monophora*, the identification of strain

69704 could only be attained after the phylogenetic analysis. Strain 69704 grouped with the type strain of *F. monophora* (CBS 269.37^T).

Usually individuals affected by chromoblastomycosis are farmers, male, with 30 years or more [25], characteristics which are consistent with our patient. Probably he has been contaminated by contact of an injured foot with soil or organic matter where fungal propagules were present, due to his occupation.

Many strategies are used in chromoblastomycosis because the treatment of this disease is extremely difficult. Often patients are refractory to various therapeutic options and are prone to relapses. In general, the management of this mycosis should be guided according to clinical, mycological, and histopathological criteria [1, 3].

Among the methods used are the physical therapies, chemotherapy and combination of both. Concerning the first category, surgical excision, cryotherapy, local therapy with heat and electrodesiccation can be highlighted [1, 2]. Regarding chemotherapy, various drugs have been used, such as ketoconazole, posaconazole, voriconazole, amphotericin B, 5-flucytosine, terbinafine, and itraconazole [26-31]. Amphotericin B and 5 - flucytosine are used in combination, as well as terbinafine and itraconazole [3, 32]. Itraconazole and terbinafine seem to be the drugs with better results for the treatment of chromoblastomycosis [2, 3, 32]. This was confirmed in our *in vitro* susceptibility assays, where these two drugs used alone showed the lowest MICs.

The combination of terbinafine and itraconazole was evaluated *in vitro* on 18 strains of *F. monophora*, and for 12 isolates this combination showed a synergistic effect and did not show an antagonistic effect [33]. In our study we found that only the combination of amphotericin B and terbinafine, and terbinafine and voriconazole were synergistic *in vitro*. It is interesting that both voriconazole and amphotericin B,

which had the highest MICs when used alone, have shown synergism when combined with terbinafine. In this sense, the use of combinations of antifungal agents in situations where there is no response to drug therapy when used alone or in cases with high severity, which usually occur in this mycosis, may be an option to enhance the efficacy of each antifungal and obtain high efficiency using low doses [34].

We know that our patient was previously treated with itraconazole, and had mycological cure, but suffered relapse. Hypothesis for this relapse are:

1. The use for 6 months or less in antifungal therapy can result in good clinical results, however relapses during therapy or after are common [3].
2. Itraconazole needs a low pH of the stomach to be properly absorbed [35]. The elderly may have a decreased production of gastric juice and this results in higher stomach pH, thus reducing the bioavailability of this drug and hence its activity [36].
3. In elderly, cells of the immune system decrease in number and defense capability, and there is a decline in the immune response [37].

In the light of the large number of recurrences and the fact that there is no treatment of choice for this neglected mycosis, the alternating use of antifungal agents which present satisfactory activity, or even the use of antifungal agents that present synergistic activity in combined form are possible ways to avoid the relapse problem. In the present study, the combination of amphotericin B and terbinafine, for example, which showed the best results *in vitro*, would be an eligible choice therapy. Furthermore, the use of molecular tools for proper identification is of utmost importance in order to generate accurate epidemiological information about the causative agents of chromoblastomycosis.

Conflict of interest

The authors declare there are no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank the CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the financial support and scholarships. CNPq Process n^o 482635/2010-0.

References

1. Queiroz-Telles F, Esterre P, Perez-Blanco M *et al.* Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol.* 2009; 47(1): 3-15.
2. Ameen M. Managing chromoblastomycosis. *Trop Doct.* 2010; 40: 65-7.
3. Torres-Guerrero E, Isa-Isa R, Isa M *et al.* Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol.* 2012; 30: 403–08.
4. Alviano DS, Kneipp LF, Lopes AH *et al.* Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. *Res Microbiol.* 2003; 154: 689–95.
5. De Hoog GS, Attili-Angelis D, Vicente VA *et al.* Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. *Med Mycol.* 2004; 42: 405-16.
6. Najafzadeh MJ, Gueidan C, Badali H *et al.* Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. *Med Mycol.* 2009; 47:17–25.

7. Najafzadeh MJ, Vicente VA, Sun J *et al.* *Fonsecaea multimorphosa* sp. nov, a new opportunistic species of *Chaetothyriales* isolated from a feline cerebral abscess. *Fungal Biol.* 2011; 115: 1066-076.(a)
8. Surash S, Tyagi A, de Hoog GS *et al.* Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea monophora*. *Med Mycol.* 2005; 43:465–72.
9. Zhang J, Xi L, Lu C *et al.* Successful treatment for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea monophora*: a report of three cases in Guangdong, China. *Mycoses* 2009; 52: 176–81.(a)
10. Bonifaz A, Paredes-Solis V, Saul A. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. *Expert Opin Pharmacother.* 2004; 5: 247–54.
11. Criado PR, Careta MF, Valente NY *et al.* Extensive long-standing chromomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*: three cases with relevant improvement under voriconazole therapy. *J Dermatol Treat.* 2011; 22 : 167–74.
12. Yang Y, Hu Y, Zhang J *et al.* A refractory case of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora* with improvement by photodynamic therapy. *Med Mycol.* 2012; 50: 649–53.
13. Najafzadeh MJ, Rezusta A, Cameo MI *et al.* Successful treatment of chromoblastomycosis of 36 years duration caused by *Fonsecaea monophora*. *Med Mycol.* 2010; 48(2): 390-93.(a)
14. Valente P, Boekhout T, Landell MF *et al.* *Bandoniozyma* gen. nov. a genus of fermentative and non-fermentative Tremellaceous yeast species. *PLoS One* 2012; 7 (10): e460 - 60.

15. Tamura K, Peterson D, Peterson N *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* 2011; 28: 2731-739.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. 2nd edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008 - Approved Standard M38-A2.
17. Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 54:854–69.
18. Gómez-López A, Cuenca-Estrella M, Mellado E *et al.* *In vitro* evaluation of combination of terbinafine with itraconazole or amphotericin B against *Zygomycota*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 45: 199–02.
19. Argenta JS, Santurio JM, Alves SH *et al.* *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:767–9.
20. Daboit TC, Duquia RP, Magagnin CM *et al.* A case of *Exophiala spinifera* infection in Southern Brazil: molecular identification and antifungal susceptibility. *Medical Mycology Case Reports* 2012; 1: 72–75.
21. Lim SW, Suh MK, Kang GS *et al.* Molecular phylogenetics of *Fonsecaea* strains isolated from chromoblastomycosis patients in South Korea. *Mycoses* 2010; 54: 415–20.
22. Najafzadeh MJ, Sun J, Vicente V *et al.* *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. *Med Mycol.* 2010; 48(6): 800-06.

23. Vicente VA, Orélis-Ribeiro R, Najafzadeh MJ, Sun J, Guerra RS, Miesch S, Ostrensky A, Meis JF, Klaassen CH, de Hoog GS, Boeger WA. Black yeast-like fungi associated with Lethargic Crab Disease (LCD) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). *Vet Microbiol.* 2012; 158: 109-22.
24. Bonifaz A, Carrasco-Gerard E, Saul A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* 2001; 44:1–7.
25. Cardoso de Brito A. Chromoblastomycosis. In: Tropical dermatology. (Tyring S, Lupi O, Hengge U, eds). New York: Churchill Livingstone, 2006. pp. 203-05.
26. Hamza SH, Mercado PJ, Skelton HG *et al.* An unusual dematiaceous fungal infection of the skin caused by *Fonsecaea pedrosoi*: a case report and review of the literature. *J Cutan Pathol.* 2003; 30: 340–43.
27. Martínez RL, Tovar LJM. Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol.* 2007; 25: 188–94.
28. Salgado CG, Silva MB, Yamano SSP *et al.* Cutaneous localized annular chromoblastomycosis. *J Cutan Pathol.* 2009; 36: 257–61.
29. Wu P, Turner ML, Cowen EW *et al.* Sixty-year-old man with slowly expanding nodular plaque on the thigh. *J Am Acad Dermatol.* 2010; 63(6): 1083–087.
30. Naveen KN, Shetty PC, Naik AS *et al.* Chromoblastomycosis presenting as a phagedenic ulcer on the face. *Int J Dermatol.* 2012, 51: 576–78.
31. França K, Villa RT, Bastos VRA *et al.* Auricular chromoblastomycosis: a case report and review of published literature. *Mycopathologia* 2011; 172:69–72.
32. Zhang J, Xi L, Zhang H *et al.* Synergistic effects of terbinafine and itraconazole on clinical isolates of *Fonsecaea monophora*. *Eur J Dermatol.* 2009; 19 (5): 451-55 (b)

33. Yu J, Ruoyu L, Zhang M *et al.* *In vitro* interactions of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblastomycosis in China. *Med Mycol.* 2008; 46: 745–7.
34. Najafzadeh MJ, Badali H, Illnait-Zaragozi MT *et al.* *In Vitro* Activities of eight antifungal drugs against 55 clinical isolates of *Fonsecaea* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54 (4): 1636–638.(c)
35. Bae SK, Park SJ, Shim EJ *et al.* Increased oral bioavailability of itraconazole and its active metabolite, 7-hydroxyitraconazole, when coadministered with a vitamin C beverage in healthy participants. *J Clin Pharmacol.* 2011; 51: 444-51.
36. Hof, H. Mycoses in the elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29: 5–13.
37. Saeed S, Sagatys E, Wasserman JR *et al.* Geriatric Fungal Infections. In: *Diagnosis of Aging Skin Diseases* (Norman RA ed.). London: Springer-Verlag, 2008. pp. 123-50.

Figure Captions



Fig. 1 (a and b) Lesions caused by *Fonsecaea monophora* (69704) in the patient's left foot and leg.(c) Direct microscopic examination (KOH 20%) revealed sclerotic cells (400X)

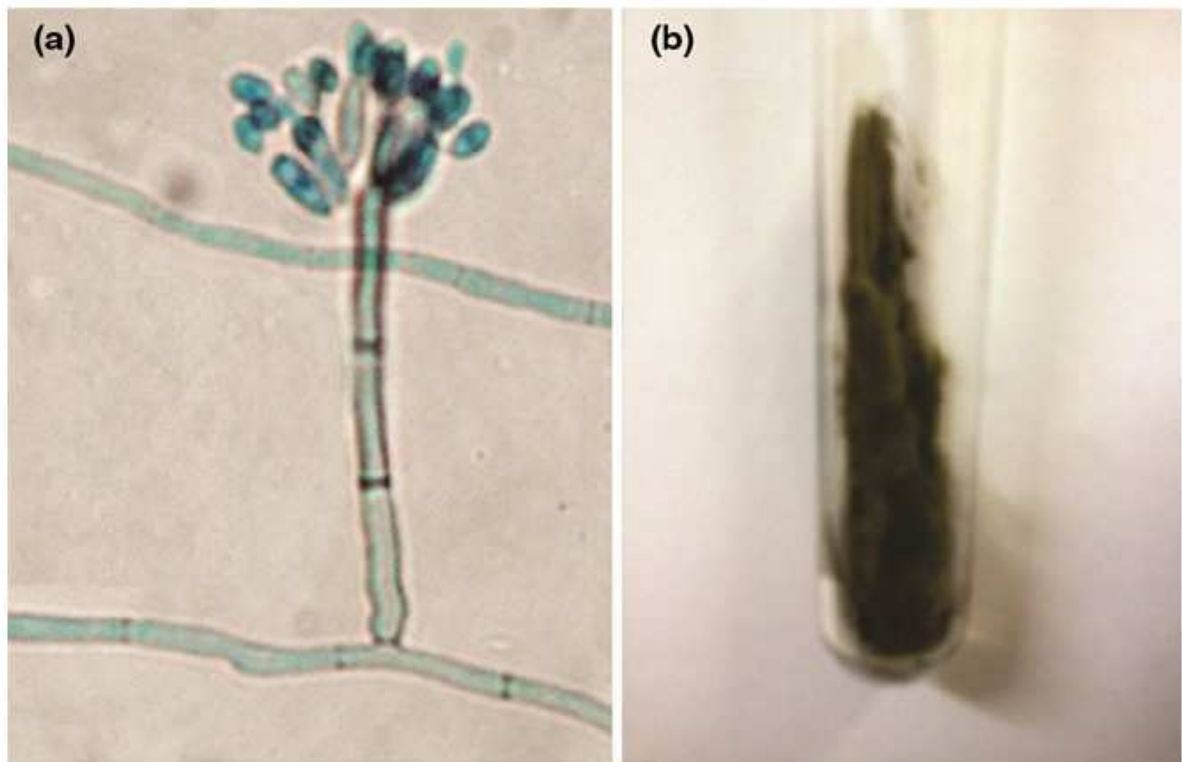


Fig. 2 (a) Lactophenol cotton blue-stained microculture of the fungus, showing septate hyphae with erected conidiophores and ovoid conidia located either at the end or at the side of conidiophores, characteristic of the genus *Fonsecaea*. (400X)

(b) Presence of dark-olivaceous filamentous colonies in Sabouraud dextrose agar cultured for 10 days, at 25 °C

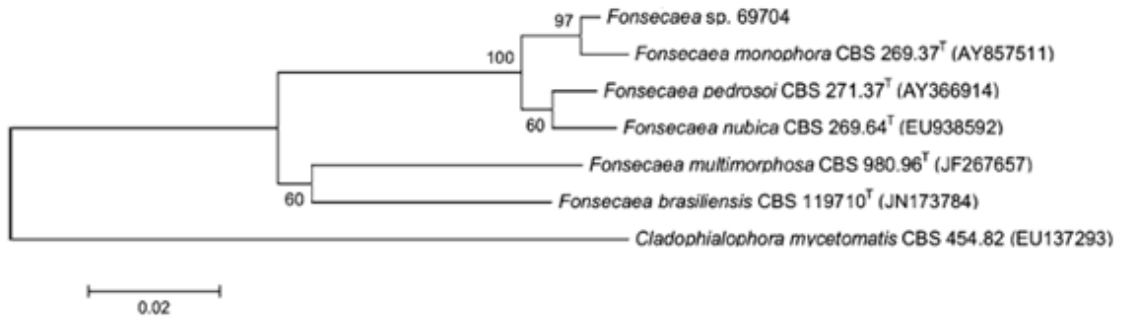


Fig. 3 ITS tree showing the phylogenetic relationship among the genus *Fonsecaea*, obtained by neighbor-joining analysis using Mega 5.0. The numbers given on the branches are the frequencies with which a given branch appeared in 1,000 bootstrap replications. *Cladophialophora mycetomatis* CBS 454.82 was used as outgroup. Strain 69704 and *Fonsecaea monophora* CBS 269.37^T are typed in boldface.

Capítulo V: *In vitro* susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and the combination of terbinafine and amphotericin B

Artigo Submetido à Revista Mycoses – Anexo 2.

In vitro susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and to the combination of terbinafine and amphotericin B

Tatiane Caroline Daboit^{1,2}, Cibele Massotti Magagnin^{1,2}, Daiane Heidrich^{1,2}, Laura Czekster Antochewis², Suelen Vigolo², Lúcia Collares Meirelles², Karine Alves², Maria Lúcia Scroferneker^{1,2}

¹ Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Short Title: Susceptibility of chromoblastomycosis agents

Keywords: *Fonsecaea* spp., *Cladophialophora carrionii*, *Rhinocladiella aquaspersa*, *Phialophora verrucosa*, *Exophiala spinifera*, *in vitro* antifungal activity, checkerboard technique, terbinafine, amphotericin B.

Correspondence: Tatiane C. Daboit e Maria L. Scroferneker

Rua Sarmiento Leite, 500, Sala 210, Porto Alegre, CEP: 90050-170, Brazil.

Tel.: +55 51 3308 3934. Fax: +55 51 3308 3121

e-mail: tatidaboit@gmail.com / scrofern@ufrgs.br

Abstract

Chromoblastomycosis is a chronic mycosis that affects the skin and subcutaneous tissues caused by several genera of dematiaceous fungi. There is not a treatment of choice. Thus, tools that help to guide clinical practice are fundamental. In this sense, antifungal activity tests *in vitro* could be useful. However, trials with chromoblastomycosis agents are scarce. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* susceptibility of 60 chromoblastomycosis agents to five antifungals and to the combination of amphotericin B and terbinafine. Terbinafine, itraconazole and ketoconazole were, in this order, the drugs which showed better activity against the chromoblastomycosis agents. The less active drugs were voriconazole and amphotericin B. The group further differentiated was *Exophiala spinifera*. *Cladophialophora carrionii* and *Fonsecaea* spp. are significantly more susceptible to ketoconazole than *Phialophora verrucosa*, while *Cladophialophora carrionii* is significantly more sensitive to voriconazole than *Phialophora verrucosa* and *Exophiala spinifera*. Based on studies with chromoblastomycosis agents in which their susceptibility was evaluated *in vitro* and in our study, we consider important to conduct these tests, because there is a very large discrepancy between susceptibility of the same genus and inter-genres in different works. This study includes the largest number of these agents and of genres, among the studies in the literature.

Introduction

Chromoblastomycosis is a chronic, progressive infection of the cutaneous and subcutaneous tissues, caused by traumatic transcutaneous implantation of propagules of several species of fungi belonging to the *Dematiaceae* family.^{1,2}

The main etiological agents of this mycosis are *Fonsecaea* spp. and *Cladophialophora carrionii*. Among the less common are *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquaspersa*, *Exophiala spinifera*.³ They are found in xerophilous plant thorns, soil, decaying vegetation, saprophytic form.^{4,5} In Brazil, it is endemic in Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais and in the Amazon region.

6-9

Generally, it affects males that perform their work barefoot, e.g. farmers, mainly in the lower limbs.^{1,5,10} The disease is characterized by the presence of sclerotic cells (parasitic stage of the fungus) together with suppurative and granulomatous tissue reaction.^{2,11}

Several treatments have been administered, but the long-term efficacy is extremely low, which inhibits the selection of a procedure or drug of choice.¹¹⁻¹³ Generally, the treatment is long and subject to relapses, and in most cases occurs the appearance of chronic forms highly resistant to therapy.^{4,14,15} In this sense, the *in vitro* susceptibility evaluation of these agents to antifungal drugs may be a way to guide the treatment of this mycosis.

The *in vitro* antifungal activity tests have advanced considerably in recent years, taking into account that before 1997 there was no standardized method available for testing with yeast, and the first standardized methodology for testing with filamentous fungi was made available only in 2002.¹⁶ Due to the recent

development of these tests, the availability of *in vitro* data of dematiaceous fungi, especially the chromoblastomycosis agents, is relatively scarce. Moreover, much of the older literature is incoherent with respect to methodology, which makes correlating results difficult.¹⁷

This study aimed to evaluate the *in vitro* susceptibility profile of 60 clinical isolates of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and to the combination of amphotericin B and terbinafine.

Materials and Methods

Microorganisms

Sixty samples of chromoblastomycosis agents were evaluated (*Fonsecaea* spp. (N = 44), *C. carrionii* (n = 6), *P. verrucosa* (n = 6), *R. aquaspersa* (n = 2), *E. spinifera* (n = 2)). Of these, 58 were clinical isolates, and 2 strains were from the American Type Culture Collection (ATCC). The strain *Candida krusei* ATCC 6258 was used as quality control.

All samples are from the fungal culture collection of Laboratory of Pathogenic Fungi, Department of Microbiology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Antifungal agents and susceptibility testing

The minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by the microdilution technique according to the M38-A2 protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute.¹⁸ The isolates were cultured on potato dextrose agar (BD, Franklin Lakes, USA) for 7 days, at 35°C, and their inocula were prepared by scraping across the surface of the fungal colonies with a pipette sterile and sterile saline solution (0,85%) . After allowed to stand for 3 to 5 min, at room temperature for deposition of larger particles, the concentration of spores in the supernatant was

adjusted spectrophotometrically (530 nm) to a percent transmission in the range 68 to 71 for *Fonsecaea* spp., *C. carrionii*, *R. aquaspersa* and *P. verrucosa* and in the range 80 to 82 for *E. spinifera*, corresponding to 1.5×10^4 to 4×10^4 UFC/ml. Viabilities were confirmed for colony count determination. The antifungals amphotericin B (AMB; Bristol-Myers Squibb, New York, USA), itraconazole (ITZ; Jansen-Cilag, São Paulo, Brazil), ketoconazole (KTZ; Quimica Farmaceutica, Bayer, Barcelona, Spain), voriconazole (VRZ; Pfizer Manufacturing Deutschland GmbH, Illertissen – Alemanha) and terbinafine (TRB; Novartis Research Institute, Vienna, Austria) were used in the final concentration range of 0.03 to 16 µg/ml. Incubation was at 35°C for up to 120 h. The MICs were determined visually by comparison of the growth in the wells containing the drug with the drug-free control, and were defined as the lowest drug concentration that impeded any visible growth, i.e., 100% inhibition.

At the same time, the combination of AMB and TRB (combination that was synergic *in vitro*, in clinical case - *Fonsecaea monophora* 69704)¹⁹ was evaluated through the checkerboard technique.²⁰ The interaction coefficient among drugs was quantitatively evaluated by means of the fractional inhibitory concentration index (FICI). The interaction was defined as synergistic if the FICI was ≤ 0.5 , no interaction if $0.5 > \text{FICI} \leq 4.0$, and antagonistic if FICI was > 4.0 , as applied in recent studies.²¹

22

Statistical analysis

To perform the comparison between groups of chromoblastomycosis agents for different antifungals, the Kruskal-Wallis nonparametric test and Dunn's Post-Hoc test were used. Differences between groups were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

The geometric mean of MICs, MIC₅₀ and the MIC ranges of the evaluated chromoblastomycosis agents are presented in Table 1.

TRB, ITZ and KTZ were, in this order, the drugs which showed better activity against the chromoblastomycosis agents, in general, with geometric mean MICs (GM MICs) lower than 0.5. The drugs less active were, respectively, VRZ and AMB, with GM MICs ≥ 2 .

Analyzing the different groups of chromoblastomycosis agents individually, we found that TRB was not the most active drug for *C. carrionii* and *E. spinifera*, and, in both groups, the more active drug was ITZ. The group further differentiated was *E. spinifera*, that, besides showing low susceptibility to TRB (GM MICs = 2), which confirms the statistical test, showed a tendency to be less susceptible to TRB than *Fonsecaea* spp. and *P. verrucosa*. Furthermore, *E. spinifera* had better sensibility to AMB than to VRZ (GM MICs = 4.0 and GM MICs = 11.314, respectively). *R. aquaspersa* had higher MICs to KTZ (GM >1) than other chromoblastomycosis agents. *C. carrionii* and *Fonsecaea* spp. are significantly more susceptible to KTZ than *P. verrucosa*, while *C. carrionii* is significantly more sensitive to VRZ than *P. verrucosa* and *E. spinifera*.

When testing drug combination of AMB and TRB, synergistic interaction, according to the FICI (FICI < 0.5), was obtained for 58 strains and indifferent interaction ($0.5 > \text{FICI} \leq 4.0$) for 2 isolates, both *E. spinifera* (Table 2). The greater synergistic effect of the combination is seen in *R. aquaspersa* (GM FICI = 0.21), with a statistically significant difference between FICI obtained for this fungus and FICI obtained by *E. spinifera*.

Discussion

Chromoblastomycosis is extremely difficult to treat because there is no standard procedure or drug. Besides, it is often unresponsive to multiple therapeutic approaches. Several treatment options have been applied, but these tend to result in low cure rates, and frequent relapses.^{1,2}

Despite being the most common aetiological agent, *Fonsecaea* spp. appears to be less sensitive to treatment with antifungal drugs than other chromoblastomycosis agents such as *C. carrionii* and *P. verrucosa*.²³

Management of chromoblastomycosis consists of long courses of antifungal chemotherapy, often combined with physical treatments such as surgery, cryotherapy and thermotherapy.²⁴ Regarding the antifungal drugs in the chromoblastomycosis treatment, we can highlight the use of ITZ and TRB alone or in combination, posaconazole (PSZ), VRZ, KTZ, AMB and 5-fluorocytosine (5-FC), being the last two used alone or in combination.^{2,10}

The therapeutic outcomes are variable and are dependent on the site of infection, the lesion size, and the patient's general conditions²⁵, and also on the etiological agent. In order to improve antifungal therapy, it is necessary to acquire more information on the *in vitro* antifungal susceptibility of chromoblastomycosis agents to antifungal agents.

Antifungal activity assays are useful for detecting resistance that may arise during treatment and predicting clinical response.^{13, 22, 26} However, few papers deal with *in vitro* susceptibility of chromoblastomycosis agents. One of the first attempts at testing the susceptibility of these agents was reported by Oliveira et al. [26]. This study evaluated the *in vitro* susceptibility of strains from patients under treatment with

5-FC. In two cases it was possible to verify the presence of resistance to this antifungal, with MIC of 60 and 100 µg/mL, already pointing to the need of these *in vitro* tests in clinical practice.

The antifungal activity of AMB was analyzed in *F. pedrosoi* 46428 ATCC strain, and the amount of lipids in conidia and hyphae was also studied.²⁷ The study found that the first structure had greater quantity of these components. The best sensitivity of conidia to AMB compared to the hyphae can be attributed to this fact. Since AMB has the mechanism of action of binding to ergosterol present in the plasmatic membrane fungal, pores are produced, resulting in loss of intracellular contents and leading cell to death.²⁸ The MIC obtained for this strain is consistent with the results we obtained. This work suggests that there is a difference in the composition of lipids in the different structures of the same strain, and it may be found a difference in the composition of these lipids in the different chromoblastomycosis agents, which would make them more or less susceptible to AMB.

The susceptibility of a *Fonsecaea pedrosoi* strain to antifungals KTZ, ITZ and saperconazole was evaluated by Cardona-Castro et al. [29]. The MICs obtained were 1.0, 0.1 and 0.01 µg/mL, respectively. The MIC obtained for ITZ is consistent with our results, while for KTZ is much higher than we obtained (GM = 0.1974).

The first study that attempted to adapt, for filamentous fungi, the technique recommended by the NCCLS (now CLSI) for yeast, evaluated the susceptibility of 12 isolates of *F. pedrosoi* to AMB, 5-FC, fluconazole (FLZ) and ITZ by broth macrodilution technique. The ITZ and AMB showed to be more effective against the fungal isolates tested with ranges of MIC of 0.018-0.6 µg/mL and 0.5-4.0 µg/mL,

respectively,³⁰ results that are close to ours. In 1998, McGinnis et al. [31] evaluated the antifungal VRZ, ITZ, AMB and FLZ against various filamentous fungi, including three strains of *F. pedrosoi* and 1 *E. spinifera*. This study also conducted an adaptation of the technique recommended by NCCLS for yeasts. The results they found were very different from ours, since the MIC for the two species of fungi was inferior to both AMB and VRZ, and far superior for ITZ. In the same year, McGinnis & Pasarell [32] also adapted the protocol M27-A (NCCLS), and tested ITZ and TRB against 21 strains of *C. carrionii*, 17 of *F. pedrosoi* and 17 of *P. verrucosa*. This study showed results consistent with our study.

The work performed by Caligiorne et al. [33] evaluated the *in vitro* antifungal activity of AMB, FLZ, ITZ and 5-FC against 19 dematiaceous fungi, and 15 of these isolates were chromoblastomycosis agents (9 strains of *F. pedrosoi*, 2 *R. aquaspersa*, 2 *C. carrionii* and 2 *P. verrucosa*). AMB and ITZ showed MIC ranges of 1.0 -16 µg/ml and 0.06-1.95 µg/ml respectively, the latter being much higher than that obtained by us. Four of the strains tested were considered resistant to AMB (MIC ≥ 4.0) and one to ITZ (MIC ≥ 1.0). This study also followed the method recommended for yeast by NCCLS, with modifications.

An assay of antifungal activity with 14 clinical isolates of *F. pedrosoi* from 6 patients was performed,¹³ when the activity of the drugs AMB, KTZ, FLZ, 5-FC, ITZ and TRB was assessed. This work found that FLZ and AMB were the least efficient antifungal agents. For KTZ and TRB, concentration ranges obtained are consistent with our work. As for AMB and ITZ, the concentration range for both was much higher than obtained through our study. In this study, the agar dilution technique was utilized and these discrepant results may be due to the solubility of these drugs, which is low in water-based vehicles (Agar), and thus, the drug is not available to act against the

fungus. An important contribution of this latter work is that it shows that, during treatment, the clinical isolates decreased their susceptibility to ITZ *in vitro*, which was reflected in decreased clinical response to this antifungal.

We can see only three studies in the literature regarding more recent studies which performed the *in vitro* evaluation of commercially available antifungal against chromoblastomycosis agents, and were based on methods recommended by the CLSI for filamentous fungi (M38-A and M38-A2).^{16,18} Through the microdilution method, the antifungal activity of AMB, ITZ, VRZ, FLZ, TRB and 5-FLU was evaluated against 39 isolates of *C. carrionii*.³⁴ *In vitro*, TRB and ITZ were the most effective antifungals, as found in our study. The correlation with clinical findings showed that the 6 patients that used the therapy with ITZ and were followed, were healed with this antifungal drug. However, despite a low MICs *in vitro*, the use of TRB, ITZ and cryosurgery was ineffective in the treatment of one patient. Correlating our results with this study, it can be seen that we obtained far superior GM to VRZ (1.123 vs. 0.07) and much lower for AMB (9.42 versus 3.175) in *C. carrionii* isolates.

The antifungal susceptibility of isolates *Exophiala* spp. was evaluated *in vitro*.³⁵ Eight *E. spinifera* isolates were tested against the antifungals AMB, ITZ, PSZ and VRZ by microdilution method. In this study, ITZ was found to be one of the most active drugs for *E. spinifera*, as observed in our study, with similar MICs. As for AMB and VRZ the MICs were lower than those obtained by us.

Najafzadeh et al. [36] evaluated 55 *Fonsecaea* spp. isolates against 8 antifungals, including AMB, ITR and VRZ. They could observe that there was no significant difference in susceptibility between the different species (*F. pedrosoi*, *F.*

monophora and *F. nubica*). ITZ was one of the most active drugs, and the susceptibility obtained by them is similar to our study findings.

The evaluation of drug combinations *in vitro* against chromoblastomycosis agents are even scarcer in the literature.

The combination between the drugs AMB, ITZ and TRB have been evaluated for chromoblastomycosis agents.³⁷ When combination of TRB and ITZ was assessed, it was synergistic for only one isolate of *C. carrionii*, while for the others it was indifferent. The combinations of AMB and TRB and AMB and ITZ were indifferent for all 53 chromoblastomycosis agents tested (*P. verrucosa* (20), *F. pedrosoi* (11) and *C. carrionii* (22)). TRB, when evaluated in isolation, revealed GM consistent with our study. However, ITZ showed GM much higher than the result in our study, and AMB showed much lower GM for *F. pedrosoi* and *P. verrucosa*, but similar for *C. carrionii*.

Taking into consideration that TRB and ITZ are drugs widely used for the treatment of infections caused by representatives of the *Fonsecaea* genus, Zhang et al. [38] evaluated the effect of this combination against 18 *F. monophora* isolates using the checkerboard technique. For the majority of isolates (12) the combination was synergistic and for none of them the combination was antagonist. We, as well, assessed this combination against a clinical isolate of *F. monophora*¹⁹ and an indifferent effect was obtained for this isolate. In the first work, ITZ and TRB were tested alone to perform the calculation of FICI and MIC ranges obtained were consistent with our results.

Combinations of TRB with AMB, ITZ and VRZ were evaluated for *F. pedrosoi* and other filamentous fungi. The combination of TRB with all the other antifungals

tested were synergistic for the isolate. However, the FICI found in the combination of AMB and TRB is much lower (FICI = 0.009) when compared with our study (FICI GM = 0.32) and the MICs obtained for all drugs alone were also much lower.³⁹ In another work by the same group, six isolates of *F. pedrosoi* were assessed against the same combinations tested in the above study, and for all isolates these combinations were synergistic. However, the FICI range obtained was much lower when compared with our results (FICI = 0.005 – 0.126 vs FICI= 0.24 - 0.49).⁴⁰

Exophiala spinifera was evaluated by Daboit et al. [22] for their susceptibility to antifungal agents ITZ, VRZ, TRB, KTZ and AMB, singly and in combination. The results for the 2 strains that were included in this study are consistent with this earlier study, in which TRB showed low susceptibility alone, ITZ was the most active drug and the combination of AMB and TRB was indifferent to this fungus. In this study we observed a correlation between the results of the *in vitro* and the therapeutic response.

Analyzing the vast majority of studies that evaluated the *in vitro* susceptibility of the chromoblastomycosis agents, we find these tests extremely important because there is a very large discrepancy in susceptibility among isolates within the same genus and between different genres. Furthermore, the use of the protocol recommended by CLSI for filamentous fungi would also help to reduce the differences in MIC values obtained between different studies. Also we observed that susceptibility testing may predict clinical response to treatment against these agents, and it is useful to identify resistant strains. Combinations of drugs are already widely used in clinical practice; it is important to evaluate them *in vitro*, using methods in order to lead the therapy. Given the difficulty of treating this mycosis, all employed methods that aim to direct clinical practice are of great value.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors thank CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the financial support and scholarships. CNPq Process nº 482635/2010-0.

References

1. Ameen M. Managing chromoblastomycosis. *Trop Doct* 2010; **40**: 65-7.
2. Torres-Guerrero E, Isa-Isa R, Isa M *et al*. Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol* 2012; **30**: 403–8.
3. Padhye AA, Hampton AA, Hampton MT, Hutton NW, Prevost-Smith E, Davis MS. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *Clin Infect Dis* 1996; **22**:331-5.
4. Minotto R, Bernardi CDV, Mallmann LF, Edelweiss MI, Scroferneker ML. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *J Am Acad Dermatol* 2001; **44**: 585-92.
5. Lupi O, Tyring SK, McGinnis MR. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. *J Am Acad Dermatol* 2005; **53**: 931-51.
6. Matte SMW. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. *Rev Soc Bras Med Tro.* 1997; **30**(4): 309 – 11.

7. Correia RTM, Valente NYS, Criado PR, Martins JEC. Chromoblastomycosis: study of 27 cases and review of medical literature. *An Bras Dermatol* 2010; **85**(4): 448-54.
8. Mouchalouat MF, Galhardo MCG, Zancopé-Oliveira MR *et al.* Chromoblastomycosis: a clinical and molecular study of 18 cases in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol* 2011; **50**: 981–86.
9. Pires CAA, Xavier MB, Quaresma JAS, Macedo GMM, Sousa BRM, Cardoso de Brito, A. Clinical, epidemiological and mycological report on 65 patients from the Eastern Amazon region with chromoblastomycosis. *An Bras Dermatol* 2012; **87**(4): 555-60.
10. Martínez RL, Tovar LJM. Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol* 2007; **25**: 188–94.
11. Queiroz-Telles F, Esterre P, Perez-Blanco M, Vitale RG, Salgado CG, Bonifaz A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol* 2009; **47**: 3 - 15.
12. McGinnis MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. *J Am Acad Dermatol* 1983; **8**(1): 1-16.
13. Andrade TS, Castro LG, Nunes RS, Gimenes VMF, Cury AE. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses* 2004; **47**: 216–21.
14. Kuttner BJ, Siegle RJ. Treatment of chromomycosis with a CO2 laser. *J Dermatol Surg Oncol* 1986; **12**: 965-8.
15. França K, Villa RT, Bastos VRA, Almeida ACC, Massucatti K, Fukumaru D, Bedin V. Auricular Chromoblastomycosis: A Case Report and Review of Published Literature. *Mycopathologia* 2011; **172**: 69–72.

16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*. 1st ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2002 Approved Standard M38-A.
17. Revankar SG. Dematiaceous fungi. *Mycoses* 2007; 50:91-101.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*. 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2008 Approved Standard M38-A2.
19. Daboit TC, Magagnin CM, Heidrich D *et al*. Chromoblastomycosis by *Fonsecaea monophora*: sensitivity to antifungal agents and molecular identification of the clinical isolate from a relapsed patient. *Mycopathologia*; No prelo, 2013.
20. Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **54**:854–69.
21. Argenta JS, Santurio JM, Alves SH, Pereira DI, Cavalheiro AS, Spanemberg A, Ferreiro L. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**:767–9.
22. Daboit TC, Duquia RP, Magagnin CM *et al*. A case of *Exophiala spinifera* infection in Southern Brazil: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Medical Mycology Case Reports* 2012; **1**: 72–5.
23. Bonifaz A, Paredes-Solis V, Saul A. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. *Expert Opin Pharmacother* 2004; **5**:247–54.

24. Ameen M. Chromoblastomycosis: clinical presentation and management. *Clin Exp Dermatol* 2009; **34**: 849–54.
25. Bonifaz A, Carrasco-Gerard E, Saúl A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* 2001; **44**:1–7.
26. Oliveira RG, Resende MA, Cisalpino EO, Figueiredo YP, Lopes CF. *In vitro* sensitivity to 5-fluorocytosine of strains isolated from patients under treatment for chromomycosis. *Int J Dermatol* 1975; **14**(2):141-3.
27. Gomes MHR, Resende M A. *Fonsecaea pedrosoi* lipid composition and determination of susceptibility to amphotericin B. *Can J Microbiol* 1992; **30**: 37-40.
28. Andriole VT. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *J Antimicrob Chemoth* 1999; **44**:151-2.
29. Cardona-Castro N, Agudelo-Flórez P, Restrepo-Molina R. Chromoblastomycosis murine model and *in vitro* test to evaluate the sensitivity of *Fonsecaea pedrosoi* to ketoconazole, itraconazole and saperconazole. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; **91**(6): 779-84.
30. Bedout C, Gómez BL, Restrepo A. *In vitro* susceptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. *Rev Inst Med trop S Paulo* 1997; **39** (3): 145–8.
31. McGinnis MR, Pasarell L. *In vitro* testing of susceptibilities of filamentous ascomycetes to voriconazole, itraconazole, and amphotericin b, with consideration of phylogenetic. *J Clin Microbiol*; 1998; **36** (8): 2353–5.
32. McGinnis MR, Pasarell L. *In vitro* evaluation of terbinafine and itraconazole against dematiaceous fungi. *Med Mycol* 1998; **36**: 243–6.

33. Caligiorne RB, Resende MA, Melillo PHC, Peluso CP, Carmo FHS, Azevedo V. *In vitro* susceptibility of chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis agents to antifungal drugs. *Med Mycol* 1999; **37**, 405–9.
34. Vitale RG, Perez-Blanco M, De Hoog GS. *In vitro* activity of antifungal drugs against *Cladophialophora* species associated with human Chromoblastomycosis. *Med Mycol* 2009; **47**: 35-40.
35. Fothergill AW, Rinaldi MG, Sutton DA. Antifungal susceptibility testing of *Exophiala* spp.: a head-to-head comparison of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *Med Mycol* 2009; **47**: 41- 3.
36. Najafzadeh MJ, Badali H, Illnait-Zaragozi MT *et al.* *In Vitro* Activities of eight antifungal drugs against 55 clinical isolates of *Fonsecaea* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54 (4): 1636–638.
37. Yu J, Li R, Zhang M , Liu L, Wan Z. *In vitro* interactions of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblastomycosis in China. *Med Mycol* 2008; **46**: 745–7.
38. Zhang J, Xi L, Zhang H *et al.* Synergistic effects of terbinafine and itraconazole on clinical isolates of *Fonsecaea monophora*. *Eur J Dermatol* 2009; **19** (5): 451-5.
39. Biancalana FSC, Lyra L, Moretti ML, Schreiber AZ. Susceptibility testing of terbinafine alone and in combination with amphotericin B, itraconazole, or voriconazole against conidia and hyphae of dematiaceous molds. *Diagn Microb Infect Dis* 2011; **71**: 378–85.
40. Biancalana FSC, Lyra L, Moretti ML, Schreiber AZ. *In vitro* evaluation of the type of interaction obtained by the combination of terbinafine and itraconazole, voriconazole, or amphotericin b against dematiaceous molds. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55** (9): 4485-7.

TABLE 1. Geometric mean MICs, MIC ranges and MIC50s obtained through *in vitro* chromoblastomycosis agents susceptibility testing to five antifungal agents .

Strain (n° strains) and antifungal drugs	MIC (µg/mL)		
	Geometric Mean	50%	Range
<i>All Chromoblastomycosis strains (n=60)</i>			
Amphotericin B	4.046	4.0	0.5 – 16
Itraconazole	0.161	0.125	0.063 – 0.5
Ketoconazole	0.247	0.25	0.063 – 2
Terbinafine	0.121	0.25	0.031 – 2
Voriconazole	2.639	2.0	0.5 – 16
<i>Fonsecaea spp. (n=44)</i>			
Amphotericin B	3.937	4.0	0.5 – 16
Itraconazole	0.166	0.19	0.063 – 0,5
Ketoconazole	0.1974	0.25	0.063 – 1
Terbinafine	0.1043	0.125	0.031 – 0,25
Voriconazole	2.494	2.0	0.5 – 16
<i>Cladophialophora carrionii (n=6)</i>			
Amphotericin B	3.175	5,0	1 – 8
Itraconazole	0.088	0.09	0.063 – 0.125
Ketoconazole	0.158	0.125	0.063 – 0.5
Terbinafine	0.177	0.125	0.125 – 1
Voriconazole	1.123	1.0	0.5 – 8
<i>Phialophora verrucosa (n=6)</i>			
Amphotericin B	6.350	8.0	4 – 8
Itraconazole	0.177	0.19	0.125 – 0.25

Ketoconazole	0.794	0.75	0.5 – 2
Terbinafine	0.088	0.09	0.063 – 0.125
Voriconazole	5.657	6.0	4 – 8

Rhinoctadiella aquaspersa (n=2)

Amphotericin B	4.000	4.0	4 – 4
Itraconazole	0.250	0.31	0.125 – 0.5
Ketoconazole	1.414	1.50	1 – 2
Terbinafine	0.177	0.19	0.125 – 0.25
Voriconazole	2.828	3.0	2 – 4

Exophiala spinifera (n=2)

Amphotericin B	4.000	4.0	4 – 4
Itraconazole	0.250	0.25	0.25 – 0.25
Ketoconazole	0,707	0.75	0.5 – 1
Terbinafine	2.000	2.0	2 – 2
Voriconazole	11.314	12.0	8 – 16

TABLE 2. Geometric mean FICIs and FICI ranges for in vitro susceptibility of chromoblastomycosis agents to amphotericin combined with terbinafine.

Strain (n° strains) and antifungal drugs	FICI		
	Geometric Mean	Range	Interpretation
All Chromoblastomycosis strains (n=60)			
Amphotericin B x Terbinafine	0.32	-	Synergistic
<i>Fonsecaea</i> spp. (n=44)			
Amphotericin B x Terbinafine	0.32	0.24 – 0.49	Synergistic
<i>Cladophialophora carrionii</i> (n=6)			
Amphotericin B x Terbinafine	0.32	0.27 – 0.37	Synergistic
<i>Phialophora verrucosa</i> (n=6)			
Amphotericin B x Terbinafine	0.29	0.24 – 0.37	Synergistic
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i> (n=2)			
Amphotericin B x Terbinafine	0.21	0.18 – 0.25	Synergistic
<i>Exophiala spinifera</i> (n=2)			
Amphotericin B x Terbinafine	0.53	0.52 – 0.53	Indifferent

FICI: fractional inhibitory concentration index.

Esta tese teve como objetivo estudar o perfil de suscetibilidade dos diferentes gêneros de agentes cromoblastomicose, avaliar esta característica em casos clínicos relevantes de micoses causadas por fungos dematiáceos, bem como identificar molecularmente os agentes etiológicos destas infecções. Além disso, avaliar os efeitos das nanoemulsões de anfotericina B e itraconazol em agentes da cromoblastomicose, assim como seus perfis em relação à citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

Como foi exposto ao longo deste trabalho, o tratamento desta micose é um desafio, e sendo assim este trabalho representa a chave para elucidar questões que não foram amplamente exploradas.

A avaliação da suscetibilidade *in vitro* dos diferentes gêneros de fungos causadores da cromoblastomicose mostrou que há uma diferença de suscetibilidade entre eles, sendo necessária a identificação do agente etiológico previamente ao início do tratamento. Os antifúngicos mais ativos, de modo geral, foram terbinafina e itraconazol, o que corrobora com estudos da literatura e com a prática terapêutica. A combinação de anfotericina B e terbinafina foi sinérgica para todos os gêneros de agentes da cromoblastomicose avaliados, com exceção de *E. spinifera*, a qual apresentou uma suscetibilidade diferenciada dos demais grupos como um todo. Esta combinação poderia ser empregada na terapêutica da cromoblastomicose. Nenhum trabalho na literatura contemplou a quantidade de isolados e gêneros por nós testados.

Em relação aos casos clínicos, no primeiro caso foi identificada, por morfologia microscópica e molecularmente, uma infecção por *E. spinifera*, que é

agente causal tanto de cromoblastomicose quanto feohifomicose. Este foi o terceiro caso de *E. spinifera* relatado no Brasil. A amostra clínica apresentou maior suscetibilidade ao itraconazol no ensaio *in vitro* e esta suscetibilidade foi confirmada na clínica. Quando avaliadas as combinações de fármacos *in vitro*, as associações de itraconazol e voriconazol e de terbinafina e voriconazol foram sinérgicas para este isolado. O uso de combinações de fármacos, geralmente utilizadas empiricamente na clínica, pode perfeitamente ser orientado por ensaios *in vitro*. No segundo caso foi diagnosticada uma cromoblastomicose por *Fonsecaea* spp.. Através de ferramentas moleculares e análise filogenética foi verificado que a amostra trata-se de uma *F. monophora*, primeiro caso relatado de cromoblastomicose por este agente causal no Brasil com recidiva das lesões. Este isolado apresentou maior suscetibilidade ao itraconazol e à terbinafina no ensaio *in vitro*, apesar do paciente ter a recorrência da micose após tratamento com itraconazol. Observamos que vários fatores podem ter influenciado esta recidiva, não apenas a suscetibilidade do agente causal ao antifúngico. Quando avaliadas as combinações de fármacos contra este isolado, as combinações de anfotericina B e terbinafina e de terbinafina e voriconazol mostraram-se sinérgicas. O uso de associação de fármacos pode ser útil em casos em que há resistência, o que é muito comum na cromoblastomicose. Além disso, com identificação molecular em casos clínicos podemos contribuir para o conhecimento da epidemiologia destes agentes.

Em relação às nanoemulsões produzidas, verificamos que a técnica empregada foi adequada para a produção de formulações com tamanho de gotícula na faixa nanométrica. Na avaliação da atividade antifúngica *in vitro*, verificou-se que a técnica empregada não é adequada para a avaliação de nanoemulsões, porque a atividade foi fármaco-dependente, ou seja, relacionada com a interação que há entre

o fármaco e o nanossistema. No ensaio *in vivo* constatamos que as nanoemulsões apresentam uma atividade antifúngica superior aos demais tratamentos avaliados. Além disso, as nanoemulsões protegeram órgãos-alvo dos efeitos adversos intrínsecos aos fármacos, hepatotoxicidade no caso do itraconazol e nefrotoxicidade para a anfotericina B. Entretanto, não basta o nanossistema apresentar atividade superior e reduzir efeitos adversos. Deve-se conhecer sua toxicidade quando comparado com o fármaco livre, para que se permita uma futura utilização na clínica. Os resultados foram satisfatórios, em que o itraconazol e a anfotericina B apresentaram efeitos citotóxicos, os quais não foram visualizados quando utilizadas as mesmas concentrações do fármaco veiculado na nanoemulsão. Assim, as nanoemulsões produzidas estariam aptas, para em um futuro próximo, serem alternativas terapêuticas para o tratamento da cromoblatomicose.

Anexo 1 : Aceite do artigo “A case of relapsed chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora*: antifungal susceptibility and phylogenetic analysis” pela Revista Mycopathologia.

MYCO-D-13-00017R1 - Editor Decision



Entrada x



Mycopathologia por editorialmanager.com

19 abr ☆



para mim ▾



inglês ▾



português ▾

[Traduzir mensagem](#)

[Desativar para: inglês](#) x

Dear Dr Daboit,

We are pleased to inform you that your manuscript, "A case of relapsed chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora*: antifungal susceptibility and phylogenetic analysis", has been accepted for publication in

Mycopathologia.

You will receive an email from Springer in due course with regards to the following items:

1. Offprints
2. Colour figures
3. Transfer of Copyright

Please remember to quote the manuscript number, **MYCO-D-13-00017R1**, whenever inquiring about your manuscript.

With best regards,
Sybren de Hoog, PhD
Editor

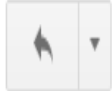
—

Anexo 2 : Submissão do artigo “A case of relapsed chromoblastomycosis
due to *Fonsecaea monophora*: antifungal susceptibility
and phylogenetic analysis” à Revista Mycoses.



MYCedoffice@wiley.com por manuscriptcentral.com

28 jan ☆



para mim ▾



inglês ▾



português ▾

[Traduzir mensagem](#)

[Desativar para: inglês](#) x

28-Jan-2013

Dear Dr Daboit:

Your manuscript entitled "In vitro susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and to the combination of terbinafine and amphotericin B" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Mycoses.

Your manuscript ID is MYC-OA-2013-033.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/myc> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/myc>.

Please note it is not necessary to submit a copyright form at this point, you will be invited to do so if your manuscript is accepted for publication.