

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

**SUSCETIBILIDADE E ADAPTAÇÕES METABÓLICAS DO AGENTE DA  
CROMOBLASTOMICOSE *FONSECAEA PEDROSI* FRENTE AO ITRACONAZOL  
E AO TRICICLAZOL UTILIZANDO FTIR E QUIMIOMETRIA**

ALESSANDRA KOEHLER

Porto Alegre

2019

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

**SUSCETIBILIDADE E ADAPTAÇÕES METABÓLICAS DO AGENTE DA  
CROMOBLASTOMICOSE *FONSECAEA PEDROSOI* FRENTE AO ITRACONAZOL  
E AO TRICICLAZOL UTILIZANDO FTIR E QUIMIOMETRIA**

ALESSANDRA KOEHLER

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Lúcia  
Scroferneker

**Coorientador:** Prof. Dr. Valeriano Antonio  
Corbellini

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em Medicina:  
Ciências Médicas, da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação  
em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2019

## CIP - Catalogação na Publicação

Koehler, Alessandra  
SUSCETIBILIDADE E ADAPTAÇÕES METABÓLICAS DO AGENTE  
DA CROMOBLASTOMICOSE FONSECAEA PEDROSOI FRENTE AO  
ITRACONAZOL E AO TRICICLAZOL UTILIZANDO FTIR E  
QUIMIOMETRIA / Alessandra Koehler. -- 2019.  
98 f.  
Orientadora: Maria Lúcia Scroferneker.

Coorientador: Valeriano Antonio Corbellini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2019.

1. Cromoblastomicose. 2. Itraconazol. 3.  
Espectroscopia FTIR. I. Scroferneker, Maria Lúcia,  
orient. II. Corbellini, Valeriano Antonio, coorient.  
III. Título.

*Nothing in this life is to be feared, it is only to be understood.  
Marie Curie.*

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Maria Lúcia Scroferneker, por ter acreditado no meu potencial e ter me dado a especial oportunidade de ingressar no mestrado sendo sua orientanda.

Ao meu coorientador Valeriano Antonio Corbellini, pelos ensinamentos e pela paciência de me introduzir no complexo mundo da espectroscopia no infravermelho.

À Daiane Heidrich, por toda a ajuda quando iniciei meus experimentos e por estar sempre disponível para responder minhas dúvidas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS pela oportunidade de realização do meu mestrado.

À Universidade de Santa Cruz do Sul por fornecer o espaço físico e toda a estrutura para a realização dos meus experimentos.

À coordenadora do Laboratório de Histologia e Patologia da UNISC, Maria Viviane Gomes Muller, e à minha colega de trabalho Crislei Tatiane Sott, por terem compreendido minhas alterações de horário.

À todos os meus amigos do bloco 20 da UNISC, em especial à Danieli Rosane Dallemole e ao Lucas Brixner Riça, pelas conversas e momentos de descontração nas horas mais difíceis.

À todos os meus professores da graduação, em especial ao professor Alexandre Rieger e à professora Tania Bernhard, por terem sido fundamentais na minha formação.

À minha mãe, Margareth Koehler, e à minha irmã, Carolina Koehler, pelo amor e apoio incondicionais.

Ao meu noivo, Vilmar Fontanive Junior, pelo amor, incentivo e apoio fundamentais, e por ter compreendido minhas ausências durante esse período.

E, por fim, agradeço a mim, pois estes foram os dois anos mais desafiadores da minha vida, nos quais superei vários obstáculos e adquiri conhecimentos que serão essenciais na minha trajetória pessoal e profissional.

## RESUMO

**Introdução:** a cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea cujo principal agente etiológico no Brasil é o fungo filamentosso dematiáceo *Fonsecaea pedrosoi*, que produz melanina dihidroxinaftaleno (DHN). O itraconazol (ITC) é um dos antifúngicos mais utilizados no tratamento, entretanto sua eficácia é variável. Dessa forma, é muito importante a realização de ensaios de suscetibilidade *in vitro*. Para fungos filamentosos, esses ensaios são realizados seguindo o protocolo M38 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), que não é voltado para utilização rotineira. Uma tecnologia inovadora para determinação da suscetibilidade a antifúngicos é a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) associada à quimiometria. Porém, não há nenhum estudo na literatura que avalia sua aplicação em ensaios de suscetibilidade para fungos filamentosos. FTIR também pode ser utilizada para estudo das adaptações metabólicas da espécie *F. pedrosoi* quando exposta ao ITC e ao triciclazol (TCZ), um inibidor da biossíntese da melanina-DHN.

**Objetivo:** Propor um modelo de predição das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) do ITC para isolados de *F. pedrosoi* e suas respectivas adaptações metabólicas, com adição de TCZ, utilizando FTIR e análises quimiométricas.

**Métodos:** Foram estudados 36 isolados genotipados de *F. pedrosoi*. A suscetibilidade ao ITC foi determinada de acordo com o protocolo M38-A2 do CLSI e com a adição de TCZ. Os isolados foram cultivados em placas somente com ágar Sabouraud e com a adição de ITC e TCZ e então preparados para a análise de Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR). Cinco espectros foram adquiridos na faixa de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$  para cada isolado. O conjunto de dados foi pré-processado por amostra por normalização pela amplitude e 1ª derivada. O algoritmo de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) foi realizado com as quintuplicatas usando uma componente de correção ortogonal de sinal (OSC) e validação cruzada *leave-one-out* para os conjuntos de calibração e predição. A Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) foram realizadas com os espectros médios das diferenças entre os testes e o tratamento padrão de cada isolado após normalização e centragem na média.

**Resultados:** os espectros médios de *F. pedrosoi* apresentaram pouca variabilidade. Os isolados resistentes se diferenciaram ( $p < 0.05$ ) dos não resistentes na região 1038  $\text{cm}^{-1}$  (estruturas da parede celular). Um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) maior que 0.99 foi obtido tanto para CIM ITC quanto para CIM ITC+TCZ no modelo FTIR-ATR/PLS. Para o modelo

CIM ITC, a Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Previsão (RMSEP) foi de 0,0645 µg/mL e o erro relativo foi de 51,6% (faixa de CIMs variando entre 0,125 e 32 µg/mL); e para CIM ITC+TCZ esses valores foram de 0,0063 µg/mL e 10,5%, respectivamente (faixa de CIMs variando entre 0,06 e 2 µg/mL). A PCA e a HCA mostraram agrupamentos de isolados resistentes e a existência de ao menos três morfotipos espectrais de *F. pedrosoi* de acordo com os tratamentos ITC/TCZ.

**Conclusão:** este foi o primeiro estudo a propor o uso de FTIR-ATR e análises quimiométricas supervisionado pelo protocolo M38-A2 para prever as CIMs de itraconazol para o fungo filamentoso *F. pedrosoi*. O novo método tem alta qualidade preditiva para uma faixa ampla de valores de CIMs. Estudos posteriores são necessários para interpretar as repercussões clínicas das adaptações metabólicas de *F. pedrosoi* com uso de ITC e TCZ.

**Palavras-chave:** cromoblastomicose; *Fonsecaea pedrosoi*; suscetibilidade a antifúngicos; FTIR-ATR; quimiometria; itraconazol; melanina-DHN.

## ABSTRACT

**Background:** chromoblastomycosis (CBM) is a subcutaneous mycosis whose main etiological agent in Brazil is the filamentous fungus *Fonsecaea pedrosoi*. Itraconazole (ITC) is one of the most used antifungals in treatment, however its efficacy is very variable. Thus, it is very important to perform in vitro susceptibility tests. For filamentous fungi, these tests are performed according to M38 protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), which is not aimed for routine use. An innovative technology for determining antifungal susceptibility is Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) combined with chemometrics. However, there isn't any study in literature that assesses its application in susceptibility tests for filamentous fungi. FTIR can also be used to study the metabolic adaptations of *F. pedrosoi* when exposed to ITC and to tricyclazole (TCZ), an DHN-melanin biosynthesis inhibitor.

**Objective:** to propose a model of ITC minimum inhibitory concentrations (MICs) prediction for *F. pedrosoi* isolates and its respective metabolic adaptations, with addition of TCZ, using FTIR and chemometric analyses.

**Methods:** Thirty-six genotyped isolates of *F. pedrosoi* were studied. Susceptibility to ITC was determined according to M38-A2 protocol of CLSI and with addition of tricyclazole (TCZ). The isolates were grown in plates with Sabouraud agar alone and with addition of ITC and TCZ and then prepared for Attenuated Total Reflection (FTIR-ATR) analysis. Five spectra were recorded from 4000 to 650  $\text{cm}^{-1}$  for each isolate. Data set was sample pre-processed by amplitude normalization and 1<sup>st</sup> derivative. Partial least squares regression (PLS) algorithm was performed with quintuplicates using one component of orthogonal signal correction (OSC) and leave-one-out step-validation for calibration and prediction set. Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) were carried out with the average spectra of the difference between the tests and the control of each isolate after normalization and mean centering.

**Results:** the average spectra of *F. pedrosoi* isolates presented little variability. Resistant isolates were differentiated ( $p < 0.05$ ) of the non-resistant by the region 1038  $\text{cm}^{-1}$  (structures of the cell wall). A coefficient of determination ( $R^2$ ) greater than 0.99 was obtained for both MIC ITC and MIC ITC+TCZ in FTIR-ATR/PLS model. For MIC ITC model, the Root Mean Square Error of Prediction (RMSEP) was 0,0645  $\mu\text{g/mL}$  and the relative error was 51,6% (MIC values ranging from 0,125 to 32  $\mu\text{g/mL}$ ); and for MIC ITC+TCZ model this values were 0,0063  $\mu\text{g/mL}$  and 10,5%, respectively (MIC values ranging from 0,06 to 2  $\mu\text{g/mL}$ ).



PCA and HCA showed clusters of resistant isolates and until three spectral morphotypes pattern of *F. pedrosoi* second the treatment with ITC/TCZ.

**Conclusion:** this was the first study to propose the use of FTIR-ATR and chemometric analyses supervised by the M38-A2 protocol for predicting itraconazole MICs of the filamentous fungus *F. pedrosoi*. The new method has high predictive quality for a wide range of MIC values. Further studies are needed to interpret the clinical repercussions of *F. pedrosoi* metabolic adaptations using ITC and TCZ.

**Keywords:** chromoblastomycosis; *Fonsecaea pedrosoi*; antifungal susceptibility; FTIR-ATR; chemometrics; itraconazole; DHN-melanin.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Estratégia de busca de estudos para a revisão da literatura.....	18
--	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Diferenciação dos gêneros causadores da CBM através das estruturas reprodutoras. (A) *Fonsecaea* spp.; (B) *Cladophialophora carrionii*; (C) *Phialophora verrucosa*; (D) *Exophiala dermatitidis*; (E) *Rhinochrysiella aquaspersa*; (F) *Cyphellophora ludoviensis*; (G) *Veronaea botryosa*; (H) *Phoma insulana*; (I) *Alternaria alternata*.....22
- Figura 2** – Distribuição mundial de casos de cromoblastomicose.....24
- Figura 3** – Classificação das lesões de acordo com Carrión (1950) (1). (A) Lesão inicial; (B) Lesão nodular; (C) Lesão verrucosa; (D) Lesão em placa; (E) Lesão tumoral; (F) Lesão cicatricial.....27
- Figura 4** – Graus de severidade das lesões de CBM. (A) Lesões leves; (B) Lesões moderadas; (C) Lesões severas.....27
- Figura 5** – Complicações em casos severos de CBM. (A) Deformação do pé com sequelas cicatriciais e discromias; (B) Lesões polimórficas com áreas fibróticas e linfedema do pênis; (C) Anquilose do joelho; (D) Massa verrucosa ulcerada com transformação neoplásica (carcinoma espinocelular); (E) Placa exofítica verrucosa com transformação neoplásica (carcinoma espinocelular); (F) Transformação neoplásica (carcinoma espinocelular) em uma lesão do pé.....28
- Figura 6** – Exame micológico direto de lesões da CBM. (A) Pontos pretos nas lesões (setas) correspondendo a áreas de eliminação transepitelial; (B) Células muriformes obtidas de raspados da lesão clarificados com solução de KOH.....29
- Figura 7** – Cultivo de *Fonsecaea pedrosoi* em ágar Sabouraud a 30°C por 21 dias.....30
- Figura 8** – Características histológicas das lesões de CBM em seções coradas com HE. (A) Reação tecidual com hiperqueratose e hiperplasia pseudoepiteliomatosa; (B) Granuloma e células muriformes dentro de células gigantes.....31
- Figura 9** – Fórmula estrutural do itraconazol.....32
- Figura 10** – (A) Cultivo de *F. pedrosoi* em ágar batata dextrose (BDA) a 30°C durante 14 dias. (B) Microcultivo de *F. pedrosoi* (aumento aproximado de 400x).....43
- Figura 11** – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das diferentes morfologias de *F. pedrosoi*. As setas indicam as possíveis formas de diferenciação.....44
- Figura 12** – Vias metabólicas de formação das melaninas: melanina-DHN (A), eumelanina (B), feomelanina (C) e neuromelanina (D).....46
- Figura 13** – Via de biossíntese da melanina-DHN (caixa em destaque) e metabólitos pentacetídeos associados (parte inferior). A linha superior evidencia a ação do triciclazol,

inibindo a redução de 1,3,6,8-THN em citalona e de 1,3,8-THN em vermelona (seu efeito inibitório é maior nesta segunda redução).....47

**Figura 14** – (A e B) Cultivo de *F. pedrosoi* em ágar Sabouraud a 30°C por 21 dias, sem (A) e com (B) 16 µg/mL de triciclazol; (C e D) Cultivo de *F. pedrosoi* em ágar batata dextrosado a 30°C por 14 dias – tubos da esquerda em cada foto suplementados com 16 µg/mL de triciclazol e tubos da direita em cada foto sem triciclazol.....50

**Figura 15** – Estrutura molecular de antifúngicos azóis mostrando a similaridade entre cetoconazol e itraconazol, diferindo de voriconazol e fluconazol (que também são semelhantes).....53

**Figura 16** – Marco conceitual da pesquisa realizada.....54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FC	<i>5-fluorocytosine</i> (5-fluorocitosina)
AMB	<i>Amphotericin B</i> (Anfotericina B)
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i> (Reflexão Total Atenuada)
BDA	Batata dextrose ágar
CBM	Cromoblastomicose
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial)
DHN	Dihidroxinaftaleno
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> (Comitê Europeu de Ensaio de Suscetibilidade Antimicrobiana)
FLU	<i>Fluconazole</i> (Fluconazol)
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier)
HCA	<i>Hierarchical cluster analysis</i> (Análise de agrupamentos hierárquicos)
HE	Hematoxilina-Eosina
ISHAM	<i>International Society for Human and Animal Micology</i> (Sociedade Internacional de Micologia Humana e Animal)
ISZ	<i>Isavuconazole</i> (Isavuconazol)
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (Espaçador interno transcrito)
ITZ	<i>Itraconazole</i> (Itraconazol)
KET	<i>Ketoconazole</i> (Cetoconazol)

KOH	Hidróxido de potássio
LDA	<i>Linear Discriminant Analysis</i> (Análise Discriminante Linear)
L-DOPA	3,4-di-hidroxi-L-fenilalanina
M27A	<i>Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard</i>  (Método de Referência para Ensaio de Suscetibilidade de Leveduras com Diluição em Caldo: Padrão Aprovado)
M38A	<i>Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard</i>  (Método de Referência para Ensaio de Suscetibilidade de Fungos Filamentosos com Diluição em Caldo: Padrão Aprovado)
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight</i>  (ionização e dessorção a laser assistida por matriz com analisador de tempo de voo)
MDC	Microdiluição em caldo
MPCC	<i>Minimal Profile Change Concentration</i>  (Concentração mínima de mudança de perfil)
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>  (Comitê Nacional para Padronização de Laboratório Clínico)
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
PLS	<i>Partial least squares regression</i>  Regressão por mínimos quadrados parciais
PSZ	<i>Posaconazole</i> (Posaconazol)

rDNA	<i>Ribosomal Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico ribossômico)
RVZ	<i>Ravuconazole</i> (Ravuconazol)
SVM	<i>Support Vector Machines</i> (Máquinas de Vetores de Suporte)
THN	Trihidroxinaftaleno
TRB	<i>Terbinafine</i> (Terbinafina)
UV	Ultravioleta
VRZ	<i>Voriconazole</i> (Voriconazol)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Cromoblastomicose .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.1 Definição e aspectos gerais.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.2 Fatos históricos .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.3 Agentes etiológicos.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1.4 Epidemiologia .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1.5 Manifestações clínicas .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1.6 Diagnóstico .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1.7 Tratamento.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2 Ensaios de suscetibilidade aos antifúngicos .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2.1 Aspectos gerais.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2.2 Métodos comerciais convencionais.....</b>	<b>36</b>
<b>2.2.3 Novos métodos não-convencionais .....</b>	<b>37</b>
<b>2.2.4 Uso de FTIR para ensaios de suscetibilidade.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2.5 Ensaios de suscetibilidade com agentes da CBM.....</b>	<b>41</b>
<b>2.3 <i>Fonsecaea pedrosoi</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>2.3.1 Aspectos gerais.....</b>	<b>42</b>
<b>2.3.2 Diferenciação celular .....</b>	<b>43</b>
<b>2.4 Melanina .....</b>	<b>44</b>
<b>2.4.1 Características e tipos .....</b>	<b>44</b>
<b>2.4.1 Melanina-DHN e inibidores.....</b>	<b>45</b>
<b>2.4.1 Funções das melaninas .....</b>	<b>49</b>
<b>2.4.2 Relação das melaninas com antifúngicos.....</b>	<b>51</b>
<b>3 MARCO CONCEITUAL .....</b>	<b>54</b>



<b>4 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>56</b>
<b>5 OBJETIVOS .....</b>	<b>58</b>
<b>5.1 Objetivo primário .....</b>	<b>58</b>
<b>5.2 Objetivos secundários .....</b>	<b>58</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>
<b>7 ARTIGO .....</b>	<b>73</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>94</b>
<b>9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>95</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea crônica, incapacitante e de natureza recalcitrante (1). Foi classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no grupo das “doenças tropicais negligenciadas”, que são endêmicas em regiões tropicais e subtropicais do planeta, afetando a população mais pobre na América Latina, África e Ásia (2,3). Os agentes etiológicos da CBM são fungos dematiáceos (melanizados) da família Herpotrichiellaceae, sendo os principais gêneros envolvidos *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Exophiala* e *Rhinocladiella* (4). Em regiões semiáridas a espécie prevalente é *C. carrionii*, enquanto nas tropicais e úmidas, como no Brasil, a principal espécie é *F. pedrosoi* (5).

A CBM possui natureza ocupacional e o início da doença ocorre com a inoculação traumática do fungo. Suas lesões são polimórficas e de crescimento lento, inicialmente assintomáticas (6,7). No entanto, com a progressão da doença podem ocorrer inúmeras complicações, como linfedema e transformações neoplásicas (8–10). O diagnóstico é feito pela presença de células muriformes nas lesões. Estas estruturas possuem paredes espessadas pela deposição de melanina di-hidroxi-naftaleno (DHN), que é o principal fator de virulência dos agentes causadores da CBM (1,11).

O tratamento é baseado na terapia com antifúngicos, a qual pode ser combinada com métodos físicos e cirúrgicos. Casos mais severos são extremamente difíceis de tratar pela natureza recalcitrante da CBM (12). Lesões causadas pela espécie *F. pedrosoi* apresentam em geral uma resistência maior ao tratamento (13). O antifúngico mais utilizado é o itraconazol (ITC), com tratamento longo de 8 a 10 meses, em média (14). No entanto, não existem ensaios clínicos randomizados para a escolha da melhor terapia (1). Nesse sentido, os ensaios de suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro* podem auxiliar nessa escolha.

Estes ensaios possuem como principal objetivo a escolha do melhor fármaco para tratar a doença causada por determinado isolado fúngico. Além disso, também permitem identificar cepas resistentes, um problema emergente e preocupante em relação aos antifúngicos (15,16). Estes ensaios determinam a concentração inibitória mínima (CIM), que é a concentração mínima de antifúngico necessária para inibir o crescimento do fungo (17). Eles são padronizados por protocolos como o M38 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). No entanto, os métodos de referência não são voltados para aplicação clínica, possuem alta complexidade, custo elevado e demandam um longo tempo de trabalho

laboratorial (18). Assim, existem testes comerciais adaptados a partir dos protocolos padrão que, apesar de serem aplicáveis nas rotinas dos laboratórios, ainda apresentam limitações. Todos são, de alguma forma, laboriosos ou possuem tempo longo para obtenção dos resultados; podem ter leituras subjetivas das CIMs; são desenvolvidos principalmente para leveduras; e possuem custo elevado, considerando a realidade brasileira (19).

Portanto, nos últimos anos, novas metodologias para ensaios de suscetibilidade *in vitro* vêm sendo desenvolvidas. Uma que possui grande potencial é a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Essa técnica gera espectros que contêm a “impressão digital” da amostra e possui amplas aplicações na área biomédica (20). Suas principais vantagens são: uso de uma quantidade muito pequena de amostra, sua preservação durante a análise e a necessidade mínima de preparação; pouca ou nenhuma geração de resíduos; rapidez da análise; precisão e reprodutibilidade; e armazenamento e manipulação dos dados de maneira diretamente computadorizada (21). Existem poucos estudos na literatura utilizando FTIR para análises de suscetibilidade; no entanto, os que usaram essa metodologia apresentaram resultados promissores (22–25). No caso dos agentes da CBM, cujos ensaios de suscetibilidade são realizados principalmente com o método de referência M38, que apresenta as limitações discutidas acima (26–29), o uso de FTIR pode disponibilizar resultados excelentes.

Um dos fatores que modifica as CIMs dos agentes da CBM para determinados antifúngicos é a produção da melanina-DHN, que atua como fator protetor e de virulência (30,31). Um inibidor de sua biossíntese é o agroquímico triciclazol. Ele é utilizado em estudos *in vitro* para estudar as funções da melanina-DHN em fungos, como os agentes da CBM (32–34). Em ensaios *in vitro*, essa melanina apresentou capacidade de se ligar a antifúngicos como o itraconazol, reduzindo sua ação efetiva. Além disso, sua presença também ocasionou um aumento considerável da CIM deste fármaco (35). No entanto, existem poucos trabalhos na literatura que avaliaram essas relações. Isso reforça a necessidade de mais estudos que verifiquem de fato qual a relação da melanina com os antifúngicos, por quais mecanismos ela afeta a atividade desses fármacos e quais são os seus reais efeitos protetivos *in vivo*. Considerando que a CBM é uma das micoses de implantação mais prevalentes em áreas tropicais e subtropicais (6) e que possui baixo investimento em pesquisas por se tratar de uma doença tropical negligenciada, é realmente fundamental a realização de estudos que ampliem o conhecimento e tragam melhorias na terapia desta micose.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura está focada nos aspectos relacionados à cromoblastomicose, aos ensaios de suscetibilidade aos antifúngicos, à espécie *Fonsecaea pedrosoi* e à melanina-DHN e seus inibidores. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed, SciELO, LILACS e Embase, no período de 24 de janeiro de 2019 a 23 de março de 2019. Posteriormente, foram incluídos alguns trabalhos publicados após março. Também foram adicionadas, em alguns tópicos, referências relevantes citadas nos artigos encontrados para embasar alguns resultados inovadores não previstos na busca inicial. Os termos utilizados na busca e o número de artigos encontrados, repetidos e incluídos em cada tópico da revisão de literatura estão apresentados na **Tabela 1**.

### 2.1 Cromoblastomicose

#### 2.1.1 Definição e aspectos gerais

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea cujos agentes etiológicos são fungos dematiáceos da ordem Chaetothyriales e família Herpotrichiellaceae. É uma doença ocupacional progressiva, incapacitante e de difícil tratamento, ocasionada pela inoculação traumática dos fungos que se encontram no ambiente. É caracterizada por uma lesão cutânea inicial e que de forma progressiva envolve tecidos subcutâneos e estruturas adjacentes. Suas lesões são polimórficas e a característica principal é a presença de células muriformes ou escleróticas no exame microscópico. A CBM é uma das micoses de implantação mais prevalentes em áreas tropicais e subtropicais do mundo (1,6).

As micoses de implantação ou micoses subcutâneas constituem um grupo diverso de doenças que inclui, além da CBM, esporotricose, micetoma, lobomicose e zigomicose. Elas afetam primariamente os tecidos cutâneos e subcutâneos, porém geralmente envolvem estruturas adjacentes e podem se tornar infecções fúngicas generalizadas. A maior parte das micoses de implantação afeta indivíduos que desenvolvem atividades ao ar livre, como agricultores. Por ocorrerem principalmente nas regiões mais pobres do mundo, essas doenças muitas vezes não são diagnosticadas corretamente e seu impacto é subestimado (4).

**Tabela 1.** Estratégia de busca de estudos para a revisão da literatura.

<b>PALAVRAS-CHAVE / BASES DE DADOS</b>	<b>PUBMED</b>	<b>SCIELO</b>	<b>LILACS</b>	<b>EMBASE</b>	<b>REPETID.</b>	<b>INCL.</b>
Chromoblastomycosis	1105	56	1202	1516	2404	96
Total de artigos em Cromoblastomycose: Definição e aspectos gerais; Fatos históricos; Agentes etiológicos; Epidemiologia; Manifestações clínicas; Diagnóstico; Tratamento						<b>96</b>
<b>Susceptibility testing</b> Obs: filtro <i>Review</i>	5327	6	6	-	5	10
<b>Infrared spectroscopy</b> AND susceptibility	744	7	4	-	6	6
<b>Chromoblastomycosis</b> AND antifungal susceptibility	29	1	1	-	0	8
Total de artigos em Ensaios de suscetibilidade aos antifúngicos: Aspectos gerais; Métodos comerciais convencionais; Novos métodos não-convencionais; Uso de FTIR para ensaios de suscetibilidade; Ensaios de suscetibilidade com agentes da CBM						<b>24</b>
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	323	56	1202	1516	667	1
Total de artigos em <i>Fonsecaea pedrosoi</i> : Aspectos gerais; Diferenciação celular						<b>1</b>
<b>DHN-melanin</b>	94	0	94	110	184	5
<b>Melanin AND</b> <b>tricyclazole</b>	46	0	45	58	93	5
<b>Melanin AND</b> <b>itraconazole</b>	28	0	29	77	54	4
<b>Tricyclazole AND</b> <b>itraconazole</b>	3	0	3	7	8	6
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> AND melanin	16	0	19	31	42	9
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> AND tricyclazole	3	0	3	4	9	5
Total de artigos em Melanina: Características e tipos; Melanina-DHN e inibidores; Funções das melaninas; Relação das melaninas com antifúngicos						<b>34</b>

Dentre todas as micoses de implantação, em 2016 apenas o micetoma era considerado pela Organização Mundial da Saúde como uma “doença tropical negligenciada”. Este é um grupo de doenças classificadas pela OMS como sendo endêmicas em regiões tropicais e subtropicais do planeta, afetando a população mais pobre da América Latina, África e Ásia (2,3). Elas não fazem parte das prioridades dos sistemas públicos de saúde e, por serem prevalentes em indivíduos de baixa renda, raramente são alvo de novas pesquisas farmacêuticas. A maioria das doenças tropicais negligenciadas definidas pela OMS são infecções causadas por helmintos, protozoários, bactérias e vírus, com poucas doenças fúngicas incluídas na lista (1). Apenas em 2017 a CBM foi adicionada a este grupo, levando em consideração que seu impacto global é comparável ou até maior que o do micetoma (4).

### **2.1.2 Fatos históricos**

Por muitos anos, a autoria da primeira descrição da cromoblastomicose foi alvo de controvérsias. Há relatos de que em 1904 foi observado um caso da doença em Cuba, que, no entanto, não foi publicado. Nas primeiras duas décadas do século XX diversos autores publicaram relatos do que possivelmente seriam casos de cromoblastomicose, porém naquela época, o termo ainda não havia sido cunhado. Esse fator também contribuiu para a controvérsia da autoria da descrição, uma vez que a CBM ainda era confundida e diagnosticada como outras doenças (36).

Em 1915, Lane e Medlar publicaram, em artigos separados, o primeiro caso norte-americano de cromoblastomicose, no qual foram isoladas células muriformes das lesões e as amostras foram classificadas como *Phialophora verrucosa* (37,38). Em 1920, Pedroso e Gomes publicaram a observação de quatro casos da doença, que foram registrados desde 1911 na cidade de São Paulo, constituindo o primeiro registro no Brasil (39). Porém, atualmente, a primeira descrição da CBM é atribuída a Maximilliano Willibaldo Rudolph, um médico alemão que trabalhava em Minas Gerais. Em 1914, ele publicou em um jornal alemão seis casos de pacientes com lesões nos membros inferiores chamadas popularmente de “figueiras”. Rudolph isolou de alguns desses pacientes colônias de micro-organismos com características muito semelhantes à *Fonsecaea pedrosoi* (1,40).

Nos primeiros casos registrados de cromoblastomicose, o micro-organismo causador da doença foi identificado como *P. verrucosa*. Porém, em 1922, as culturas originais dos casos publicados por Pedroso e Gomes foram reanalisadas e diferentes tipos de reprodução

foram verificados, fazendo o fungo ser renomeado de *Hormodendrum pedrosoi* (41). Porém, o fato de o mesmo fungo apresentar três tipos de conidiação diferentes levou a várias descrições enganosas, ocasionando que o mesmo isolado (hoje *F. pedrosoi*) tenha recebido nove nomes diferentes em publicações ao longo do século XX (42). Entretanto, em 1936, Pablo Negroni estudou diversos isolados fúngicos de casos de cromoblastomicose, criando o gênero *Fonsecaea* e validando a espécie *Fonsecaea pedrosoi*, um dos mais frequentes agentes etiológicos da CBM (1,43).

Apesar de casos terem sido amplamente publicados desde o começo do século XX, o termo “cromoblastomicose” foi usado a primeira vez apenas em 1922 por Terra e colaboradores, que acreditavam inicialmente que essa doença era intimamente relacionada à blastomicose, um outro tipo de infecção fúngica causada por *Blastomyces dermatitis*. Porém, as duas doenças são diferentes no que se refere ao tipo de célula fúngica presente nos tecidos do hospedeiro (42,44). Para evitar essa confusão entre as duas doenças, em 1935 Moore e Almeida propuseram o termo “cromomicose” em substituição a “cromoblastomicose” (45). Entretanto, ao longo do tempo esse termo começou a ser usado como denominação para um grupo diverso de doenças causadas por fungos dematiáceos. Este problema de confusão entre a CBM e outras infecções fúngicas foi resolvido em 1974 por Ajello e colaboradores, que criaram o termo “feo-hifomicose” para englobar todas as infecções clinicamente diferentes da cromoblastomicose (46). Apesar de esta doença ter inúmeras denominações em variados países, a Sociedade Internacional de Micologia Humana e Animal (ISHAM) decidiu em 1992 que o termo mais correto é “cromoblastomicose” (1,42).

### 2.1.3 Agentes etiológicos

Os agentes etiológicos da CBM são, em sua maioria, membros de uma única ordem fúngica, a Chaetothyriales, que possui uma única família, denominada Herpotrichiellaceae. Essa ordem possui diversos gêneros, sendo que a maior parte deles (incluindo os agentes da CBM) são fungos filamentosos em cultivo. Apenas o gênero *Exophiala* é capaz de se reproduzir por brotamento. Independente destas características, todas as espécies da ordem Chaetothyriales apresentam crescimento lento e possuem melanina di-hidroxinaftaleno (DHN), que confere às colônias uma cor escurecida (1).

Os principais gêneros fúngicos envolvidos em casos de CBM são *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Exophiala* e *Rhinochadiella*. Dentre esses gêneros, as

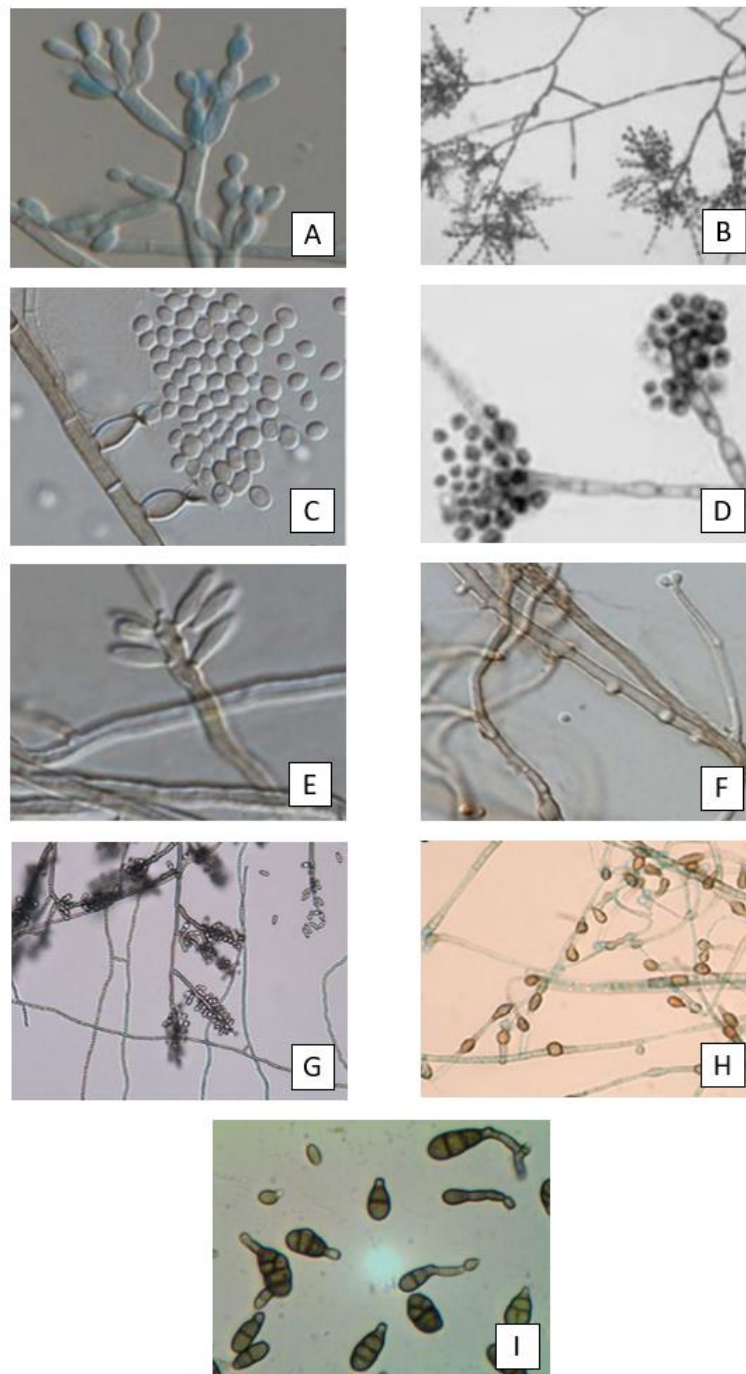
espécies mais prevalentes que causam CBM são *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *C. carrionii* (4). Outras espécies relativamente comuns também incluem *P. verrucosa*, *F. nubica* e *E. spinifera* (6). Porém, nos últimos anos, diversos relatos de caso vêm revelando novos agentes etiológicos, como *Phoma insulana* (47), *Alternaria alternata* (48), *Cladosporium langeronii* (49), *Cladophialophora arxii* (50), *Veronaea botryosa* (51), *Rhinocladiella phaeophora* (52), *Exophiala psychrophila* (53), *Cyphellophora ludoviensis*, *Rhinocladiella tropicalis* (54) e *Fonsecaea pugnacius* (55).

A distinção entre os gêneros é feita pela morfologia do modo de reprodução assexuada dos fungos, que está representado na **Figura 1**. Em *Fonsecaea* (**A**), os conídios são agrupados em dentículos e organizados em cadeias curtas; em *Cladophialophora* (**B**), eles são organizados em cadeias retas e longas; em *Phialophora* (**C**), os conídios são produzidos em cabeças viscosas e unidas em colares; em *Exophiala* (**D**), as células produtoras são anelídeas e apresentam intenso brotamento; em *Rhinocladiella* (**E**), os conídios são produzidos simpodialmente em extensões celulares. Estes são os cinco gêneros mais comumente associados com a CBM (1). Os outros gêneros recentemente associados à CBM também possuem formas diferentes de produção de conídios. Em *Cyphellophora* (**F**), o modo é semelhante ao citado para *Phialophora*, com a distinção dos conídios serem mais curvados e septados; em *Veronaea* (**G**), conidióforos longos produzem conídios simpodiais com duas células (1); em *Phoma* (**H**), clamidósporos globosos ou piriformes, intercalares, terminais ou em corrente de diferentes tamanhos são observados (47); e em *Alternaria* (**I**), são observados conídios grandes, ramificados e com septos transversais e longitudinais (48).

Para diferenciação ao nível de espécie, é necessário realizar o sequenciamento de genes alvo, pois as espécies de um mesmo gênero comumente apresentam estruturas morfológicas iguais (1). Nos fungos, a identificação molecular ao nível de espécie usualmente é feita com a região espaçadora interna do rDNA (região ITS). Para algumas espécies intimamente relacionadas, como no gênero *Fonsecaea*, pode ser necessário utilizar em conjunto outros genes, como o gene da  $\beta$ -tubulina e o gene da actina (56). Diversos estudos têm sido realizados nos últimos anos com o objetivo de identificar molecularmente isolados de fungos causadores da CBM, principalmente do gênero *Fonsecaea* (57–60). Isso é relevante, pois apesar das quatro espécies desse gênero (*F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. pugnacius*) apresentarem morfologia semelhante, sua patogenicidade é muito diferente, com algumas delas causando outros tipos de infecções mais graves (58). Em alguns desses estudos até mesmo foram descritas novas espécies, como no trabalho de Gomes e



colaboradores, no qual foram descritas *Cyphellophora ludoviensis* e *Rhinocladiella tropicalis* (54).



**Figura 1.** Diferenciação dos gêneros causadores da CBM através das estruturas reprodutoras. (A) *Fonsecaea* spp.; (B) *Cladophialophora carrionii*; (C) *Phialophora verrucosa*; (D) *Exophiala dermatitidis*; (E) *Rhinocladiella aquaspersa*; (F) *Cyphellophora ludoviensis*; (G) *Veronaea botryosa*; (H) *Phoma insulana*; (I) *Alternaria alternata*.

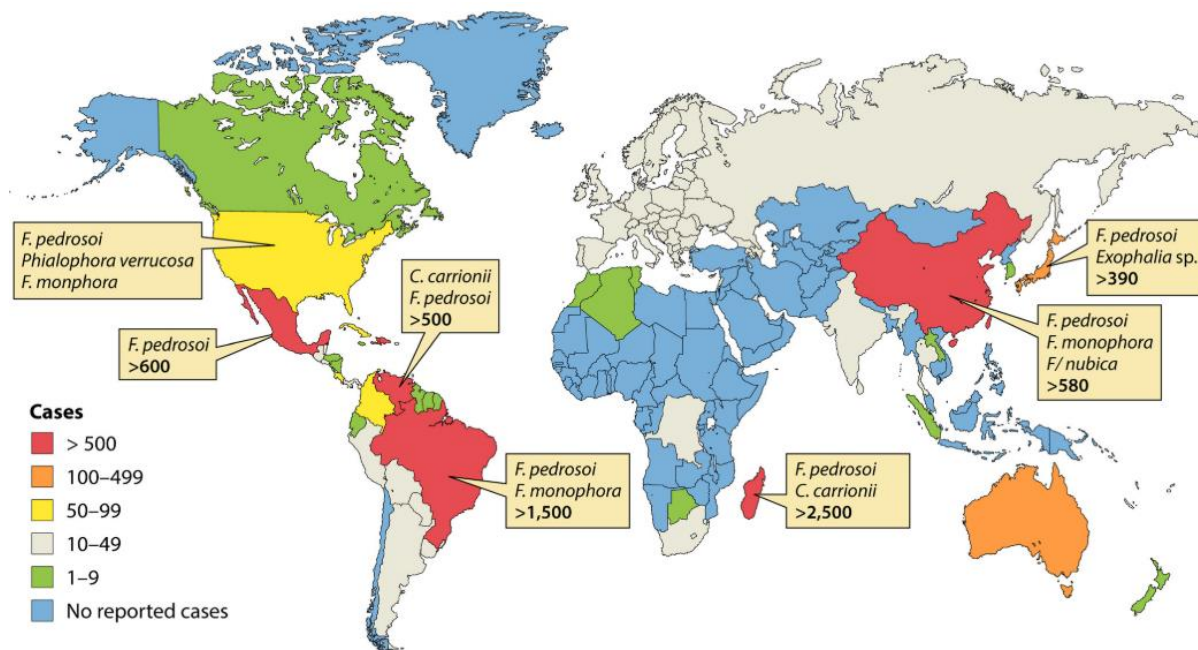
Fonte: Adaptado de Queiroz-Telles et al. (1); Gomes et al. (54); Zhu et al. (51); Hernández-Hernández et al. (47); Liu et al. (48).

#### 2.1.4 Epidemiologia

A cromoblastomicose é uma doença que tem ocorrência mundial, no entanto sua maior prevalência está na área entre a latitude 30° Norte e a latitude 30° Sul, correspondendo a grande parte das zonas tropicais e subtropicais do mundo. Assim como a maior parte das micoses endêmicas, a CBM não possui notificação compulsória. Dessa forma, todas as informações epidemiológicas são baseadas em relatos e séries de casos. Estima-se que a incidência da CBM varie de 1:6.800 em Madagascar e 1:8.625.000 nos Estados Unidos. A distribuição das espécies que causam a CBM também varia de acordo com a região. *F. pedrosoi* é encontrada principalmente em regiões tropicais e úmidas, enquanto *C. carrionii* é comum em áreas semiáridas (1,5,61).

A maior parte dos casos de CBM é reportada na América do Sul, África e Ásia. Madagascar, Brasil, México, Índia, Venezuela, Austrália e o sul da China são, nesta ordem, os países com o maior número de casos registrados até a atualidade (**Figura 2**) (1). Em Madagascar, um estudo publicado em 1997 registrou 1323 casos observados entre 1955 e 1995. Neste mesmo trabalho, foram descritos dois ecossistemas na ilha, um ao norte com clima úmido e floresta tropical, onde *F. pedrosoi* é isolado frequentemente, e outro ao sul, com clima árido e deserto, onde *C. carrionii* é a espécie mais frequente (62). Isso corrobora a distribuição mundial dessas espécies de acordo com o clima encontrado. Apesar da alta prevalência, a CBM continua sendo uma doença negligenciada em Madagascar, devido à falta de diagnóstico e tratamento corretos. Além disso, desde 1997 não são publicados estudos avaliando novos casos na ilha (63).

No Brasil, a região Amazônica, especificamente o estado do Pará, é a que possui o maior número de casos registrados, sendo considerada a principal área endêmica do país. Acredita-se que isso se deva às grandes precipitações anuais, ao clima tropical e úmido e à falta de desenvolvimento na região, sendo que a CBM ainda tem um grande impacto na população local (64,65). Devido ao seu clima majoritariamente tropical, a espécie mais frequentemente encontrada no Brasil é *F. pedrosoi*, com alguns poucos relatos de *P. verrucosa* e *E. spinifera* (1). No Rio Grande do Sul, especificamente, um estudo publicado em 2001 revisou 100 casos registrados entre 1963 e 1998. Em nosso estado, o maior número de casos ocorre na região das Missões e Alto Uruguai e a principal espécie encontrada é *F. pedrosoi*, com apenas poucos isolados de *P. verrucosa* (66).



**Figura 2.** Distribuição mundial de casos de cromoblastomicose.

Fonte: Queiroz-Telles et al. (1).

Apesar de ser mais frequente em regiões tropicais e subtropicais, há alguns casos de CBM registrados para a Europa. Em muitos deles a doença foi importada de outros países, porém nos últimos anos foram feitos registros de casos autóctones. Em 2014, foi publicado um caso de infecção por *F. monophora* na Polônia, e os autores realizaram uma revisão da literatura na qual sugeriram a existência de 31 possíveis casos de CBM em países europeus (67). Neste mesmo ano, foi publicado um caso de CBM por *F. nubica* na França (68) e, em 2017 e 2018, dois casos de CBM adquiridos na Catalunha, Espanha, causados respectivamente por *F. pedrosoi* e *R. similis* (69,70). Dessa forma, isso demonstra que micoses tropicais podem ocorrer em áreas temperadas de forma autóctone, reforçando a necessidade de uma maior atenção no diagnóstico de casos suspeitos, que muitas vezes são diagnosticados erroneamente como condições que imitam a CBM (1,67).

A CBM é uma doença ocupacional e, na maior parte dos casos registrados, está fortemente associada à agricultura e outras atividades nas quais se entra em contato com o solo e plantas, como jardineiros, madeireiros, mineradores, carpinteiros, entre outros (1). Os fungos causadores da CBM fazem parte da microbiota saprófita, que decompõe matéria orgânica no solo e madeira, sendo também encontrado em plantas. O primeiro isolado ambiental de agentes da CBM ocorreu em 1937, no qual *P. verrucosa* foi encontrada no solo (42). No Brasil, também já foram encontradas possíveis fontes de contaminação ambiental

com os fungos causadores da CBM. Em uma região endêmica do estado do Maranhão, acredita-se que a contaminação venha do babaçu (*Orbignya phalerata*). Nesse local muitas pessoas trabalham manualmente na extração das amêndoas do babaçu sentadas sobre as cascas no chão e, com isso, se machucam acidentalmente, podendo contrair a cromoblastomicose (71). Outro estudo isolou *F. pedrosoi* dos espinhos de *Mimosa pudica*, a planta conhecida popularmente como “dormideira” ou “dorme-dorme”, muito comum nas áreas rurais do Brasil (72).

A cromoblastomicose afeta principalmente homens adultos, com a proporção homens:mulheres variando de acordo com o estudo. Em pesquisas realizadas no Brasil, variou de 4:1 na região Sul (66) até 17:1 na região Norte (64). A princípio, acreditava-se que isso se devia à maior proporção de homens desenvolvendo atividades agrícolas. No entanto, hoje sabe-se que a progesterona apresenta um possível efeito protetor contra as manifestações clínicas da CBM (73). A média de idade dos pacientes também varia dependendo do estudo. Em pesquisas realizadas no Brasil nas regiões Norte, Sudeste e Sul, somando um total de 443 pacientes, as idades variaram entre 21 a 85 anos, com uma média de 57 anos (64,66,74). Relatos de casos em crianças são raros. Apesar disso, entre 1992 e 2004, foram registrados 22 casos de CBM causada por *C. carrionii* em crianças e adolescentes (2 – 19 anos) em uma área endêmica na Venezuela (75).

A CBM é uma doença que afeta principalmente indivíduos imunocompetentes, com apenas alguns relatos de casos envolvendo pacientes imunocomprometidos. Nesses casos, a CBM geralmente está relacionada com o transplante de órgãos sólidos como os rins (76–78). É uma micose considerada exclusivamente humana, pois há raros relatos de infecção em outros animais, como em felinos (79) e anfíbios (80) e, além disso, esses casos são considerados como feo-hifomicose, pois apenas os humanos apresentam células muriformes nas lesões, uma característica básica da CBM (1). A CBM também está associada a desastres naturais, como exemplificado pelos casos registrados nos Estados Unidos após o furacão Ike, pois desastres naturais como este criam mais ambientes propícios para a proliferação de fungos como os agentes da CBM (81).

### **2.1.5 Manifestações clínicas**

As lesões da CBM iniciam após ocorrer a inoculação traumática de propágulos dos agentes etiológicos. O tempo entre a inoculação e a lesão inicial é incerto, podendo variar de

semanas a meses, e muitas vezes os pacientes não recordam terem sofrido alguma injúria que acarretasse a inoculação do fungo (1,7). Clinicamente, a CBM inicia como uma pápula ou nódulo eritematoso, pequeno e unilateral (**Figura 3A**). As lesões iniciais são oligossintomáticas ou assintomáticas e não interferem nas atividades cotidianas, o que faz muitos pacientes procurarem auxílio médico apenas após meses ou anos. Com a progressão da doença, o principal sintoma presente é prurido que pode ser raramente acompanhado por dor local. À medida que as lesões se agravam, podem ocorrer infecções bacterianas secundárias e edema, impactando na qualidade de vida do paciente (6,7).

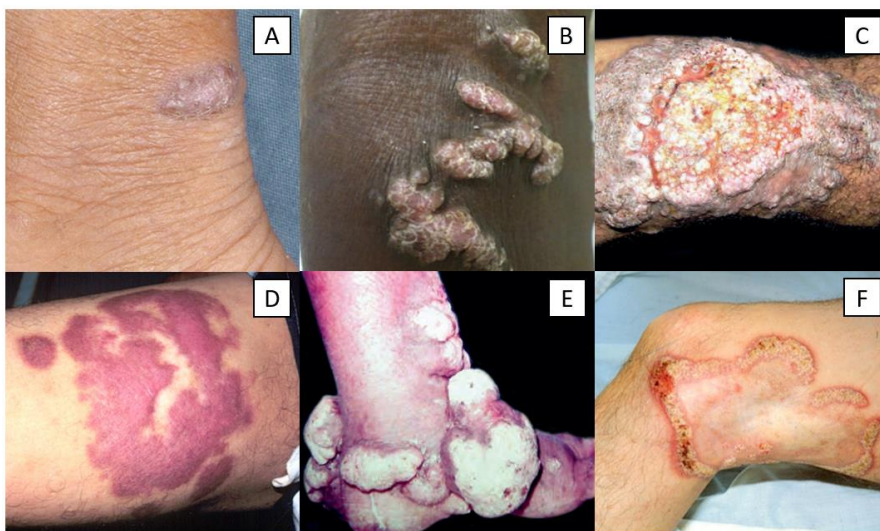
As lesões da CBM são clinicamente polimórficas, o que levou diversos autores a desenvolver sistemas de classificação. Atualmente, as lesões são classificadas de acordo com o sistema proposto por Carrión em 1950 (82). O autor propôs cinco tipos diferentes de lesões: nodular, verrucosa, placa, tumoral e cicatricial. As lesões nodulares são fibróticas, com nódulos eritêmato-violáceos e superfície lisa ou hiperkeratótica (**Figura 3B**). As verrucosas possuem aspecto de couve-flor, pontos pretos e são hiperkeratóticas (**Figura 3C**). As lesões em placas são eritematosas ou violáceas, circunscritas, com bordas irregulares e elevadas e apresentam pontos pretos (**Figura 3D**). As lesões tumorais são lobuladas isoladas ou em conjunto, com superfície lisa ou vegetativa (**Figura 3E**). As de forma cicatricial são lesões anulares, irregulares com crescimento centrífugo e áreas atróficas centrais (**Figura 3F**) (6). A forma nodular é a manifestação clínica mais comum, correspondendo a cerca de 40% dos casos, seguida da forma verrucosa, com cerca de 26% dos casos (83).

Para planejar o tratamento, com a dose correta de antifúngico, também é necessário classificar as lesões da CBM de acordo com sua severidade. Lesões leves são únicas, do tipo nodular ou placa, com menos de 5 cm de diâmetro (**Figura 4A**). Lesões moderadas são únicas ou múltiplas, de forma nodular, verrucosa ou placa, com menos de 15 cm de diâmetro (**Figura 4B**). Já lesões severas são únicas ou múltiplas, cobrindo grandes extensões da pele (**Figura 4C**) (6). O grau de severidade está associado com o tempo de evolução, o local afetado, os hábitos de higiene e o tratamento correto (1).

As áreas mais comuns de lesões da CBM são as extremidades inferiores, correspondendo a cerca de 85% dos casos, devido à maior exposição dessa parte do corpo a possíveis traumas; seguido das extremidades superiores, principalmente o dorso da mão (41,83). No entanto, há relatos de lesões em diversas outras áreas, como a face, as orelhas, os olhos, a região oral, os glúteos, o tronco, a região genital, a axila e os ombros (64,71,84–92). As lesões iniciais podem se espalhar para áreas contíguas, através da autoinoculação que



ocorre no ato de se coçar. Já lesões satélite em áreas remotas são causadas por propagação pelo sistema linfático e, mais raramente, através da corrente sanguínea (6,93). Entretanto, as lesões da CBM afetam primariamente o tecido cutâneo e subcutâneo e a disseminação para órgãos internos é extremamente rara. Na literatura há alguns relatos de cromoblastomicose disseminada no cérebro, medula, tecido muscular e pulmões (94–97). Na maior parte destes casos os pacientes eram imunocomprometidos.



**Figura 3.** Classificação das lesões de acordo com Carrion (1). (A) Lesão inicial; (B) Lesão nodular; (C) Lesão verrucosa; (D) Lesão em placa; (E) Lesão tumoral; (F) Lesão cicatricial.

Fonte: Adaptado de Queiroz-Telles et al. (1); Brito et al. (6).



**Figura 4.** Graus de severidade das lesões de CBM. (A) Lesões leves; (B) Lesões moderadas; (C) Lesões severas.

Fonte: Adaptado de Queiroz-Telles et al. (1).

Se as lesões não forem tratadas quando são pequenas, a cromoblastomicose pode levar a inúmeras complicações e sequelas que afetam muito a vida do paciente, levando à incapacidade para trabalhar e ao isolamento social. Com o aumento do grau de severidade da doença, ocorrem alterações fibróticas nos tecidos e estase linfática, que leva ao linfedema e consequentes deformidades das áreas afetadas. Infecções bacterianas secundárias também são comuns, que ocasionam dor local e contribuem para o comprometimento linfático. Neste estágio, mais de um tipo de lesão característica da CBM podem ser encontradas no mesmo paciente (1,93). Nos casos mais severos, são observadas deformações (**Figura 5A**), linfedema crônico (**Figura 5B**), anquilose (**Figura 5C**) e transformações neoplásicas, principalmente carcinoma espinocelular (**Figura 5D, 5E, 5F**) (1,8–10,61,98). Estas complicações são muito graves e afetam enormemente a vida do paciente, podendo até mesmo levá-lo à incapacidade permanente ou a óbito, como é observado em muitos casos em que ocorrem transformações neoplásicas.



**Figura 5.** Complicações em casos severos de CBM. (A) Deformação do pé com sequelas cicatriciais e discromias; (B) Lesões polimórficas com áreas fibróticas e linfedema do pênis; (C) Anquilose do joelho; (D) Massa verrucosa ulcerada com transformação neoplásica (carcinoma espinocelular); (E) Placa exofítica verrucosa com transformação neoplásica (carcinoma espinocelular); (F) Transformação neoplásica (carcinoma espinocelular) em uma lesão do pé.

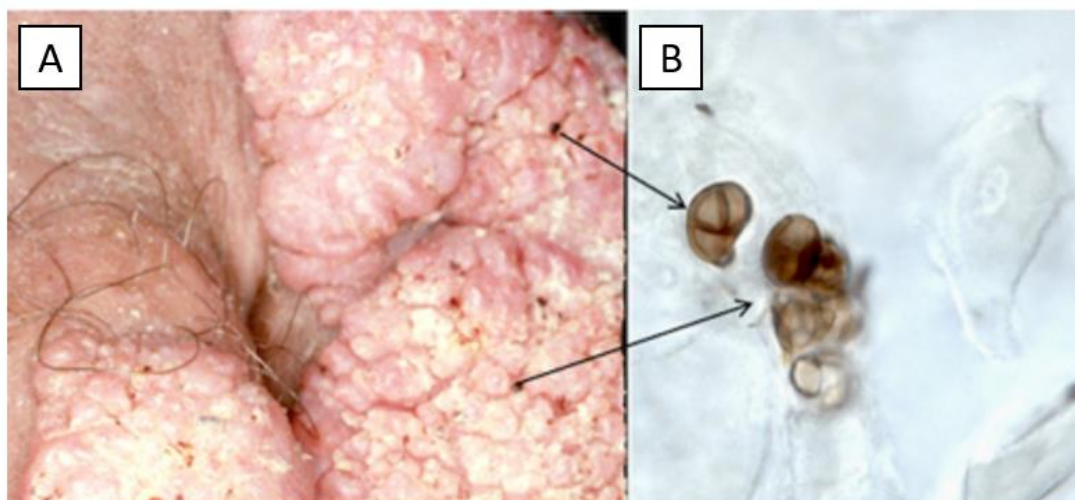
Fonte: Adaptado de Solórzano et al. (98); Gomes et al. (8); Queiroz-Telles (61); Jamil et al. (9); Campos et al. (10); Queiroz-Telles et al. (1).

Como pode ser visto nas imagens, as lesões da CBM são polimórficas e podem mimetizar um amplo espectro de doenças infecciosas e não infecciosas, como feo-hifomicose,

paracoccidioidomicose, esporotricose, lobomicose, coccidioidomicose, blastomicose, leishmaniose, micetoma, hanseníase, tuberculose cutânea, infecções por micobactérias não-tuberculosas, prototecose, rinosporidiose, botriomicose, sífilis terciária, ectima, sarcoidose, psoríase, halogenoderma e neoplasias (6). Portanto, a confirmação da cromoblastomicose deve ser sempre feita através de exames histopatológicos e/ou micológicos (7).

### 2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da CBM é feito pela presença de células muriformes ou escleróticas no exame microscópico das lesões. Estas células possuem coloração castanha, paredes espessas pela deposição de melanina-DHN e 5 a 15 micrômetros de diâmetro. Elas podem ser encontradas isoladas ou em grupos e possuem um ou dois septos. Estas células são facilmente encontradas superficialmente nas lesões, onde existem pequenos pontos escuros, que correspondem a áreas de eliminação transepitelial, onde também são depositados restos celulares, tecidos danificados e crostas hemáticas (**Figura 6**). O exame micológico direto é realizado a partir de raspados de pele dessas regiões e clarificados com solução de 10 a 40% de hidróxido de potássio (KOH). Este exame é simples, rápido e de baixo custo e sua sensibilidade é de 90 a 100% (1,11).

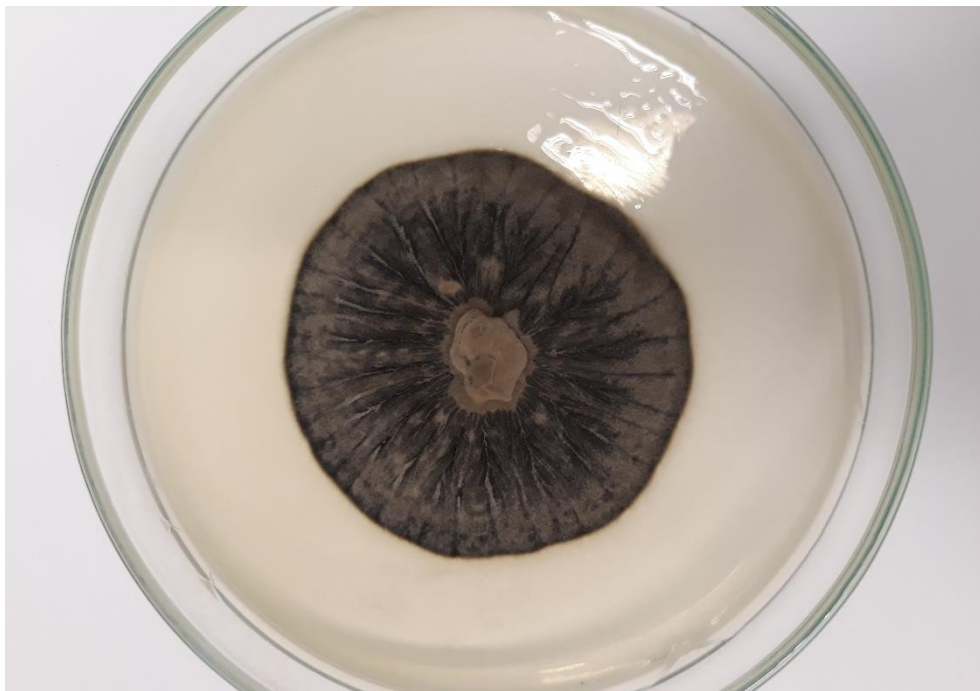


**Figura 6.** Exame micológico direto de lesões da CBM. **(A)** Pontos pretos nas lesões (setas) correspondendo a áreas de eliminação transepitelial; **(B)** Células muriformes obtidas de raspados da lesão clarificados com solução de KOH.

Fonte: Adaptado de Queiroz-Telles et al. (1).



Apesar do exame micológico direto das lesões ser muito eficiente, é importante a utilização de técnicas como o microcultivo para a identificação das espécies de fungos, auxiliando na escolha do tratamento adequado. Além disso, esta identificação contribui para dados epidemiológicos, fornecendo informações sobre a diversidade dos agentes etiológicos em diferentes locais do mundo (1). O cultivo é feito em ágar Sabouraud suplementado ou não com antibióticos a uma temperatura de 25 a 30°C. O crescimento é lento, com média de 25 a 30 dias, mas podendo chegar até a seis semanas. As colônias são aveludadas, com a cor variando entre tons de verde escuro, cinza e preto, característico de fungos dematiáceos (**Figura 7**) (11,41). O exame macroscópico da colônia e as técnicas de microcultivo para visualização dos tipos de esporulação (**Figura 1**) permitem a distinção ao nível de gênero. Para identificação ao nível de espécie é necessário utilizar técnicas de biologia molecular (42). O sequenciamento da região ITS do DNA é a forma mais utilizada para diferenciar espécies de agentes da CBM (99–101). Porém, estas técnicas estão disponíveis apenas em poucos serviços de saúde e são utilizadas para fins de pesquisa, não de diagnóstico.

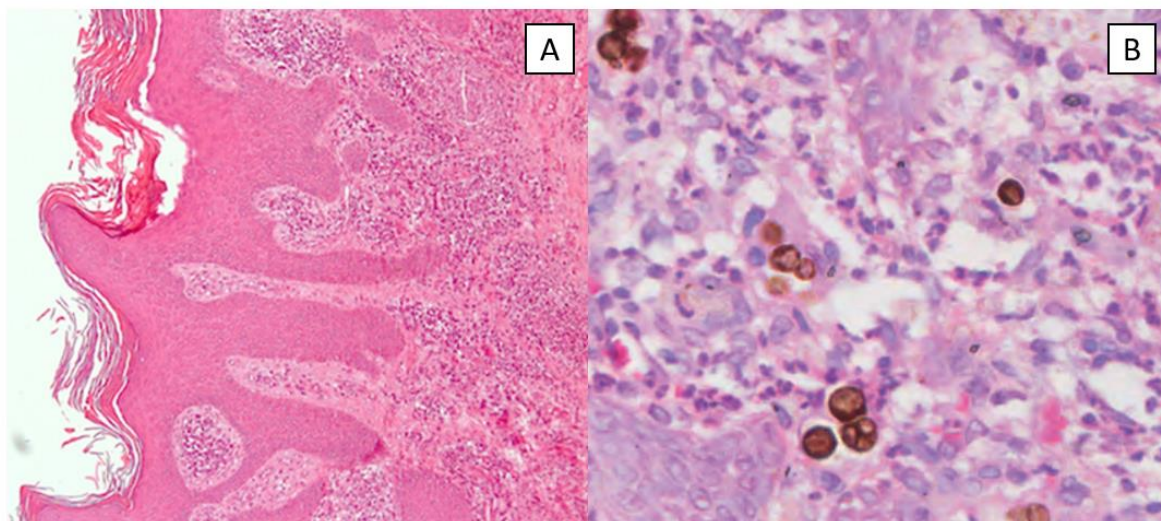


**Figura 7.** Cultivo de *Fonsecaea pedrosoi* em ágar Sabouraud a 30°C por 21 dias.

Fonte: Autoria própria.

Histologicamente, a resposta tecidual nas lesões de cromoblastomicose não são específicas, sendo similares àquelas observadas na maior parte das micoses de implantação. A resposta ao fungo é tipicamente mista, com inflamação granulomatosa, microabscessos e

células gigantes. No estrato córneo e epitélio, as características principais são hiperqueratose e hiperplasia pseudoepiteliomatosa. A derme apresenta um infiltrado difuso e diferentes graus de fibrose, consistindo em células mononucleares, epitelioides, gigantes e polimorfonucleares. As células muriformes são encontradas dentro das células gigantes e são facilmente identificadas pela coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) (**Figura 8**) (6,93).



**Figura 8.** Características histológicas das lesões de CBM em seções coradas com HE. (A) Reação tecidual com hiperqueratose e hiperplasia pseudoepiteliomatosa; (B) Granuloma e células muriformes dentro de células gigantes.

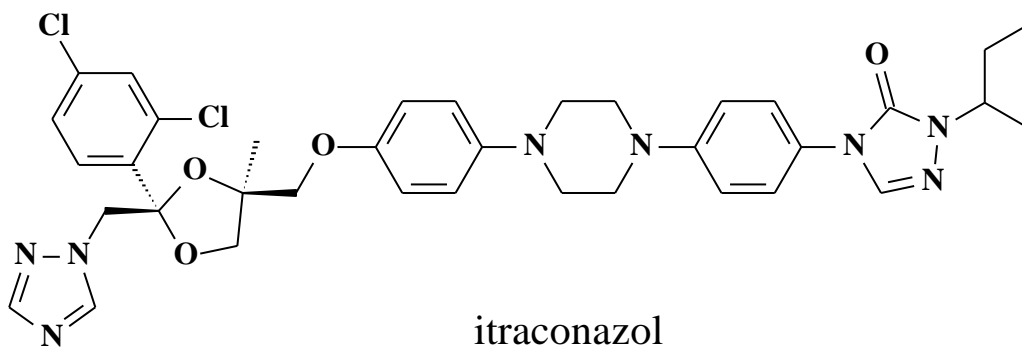
Fonte: Adaptado de Queiroz-Telles et al. (1); Brito et al. (6).

### 2.1.7 Tratamento

Assim como na maior parte das doenças tropicais negligenciadas, não existem ensaios clínicos randomizados para a escolha da melhor terapia para a cromoblastomicose. A seleção do tratamento é feita com base em ensaios clínicos abertos, relatos de caso e opiniões de especialistas (1). Existem diversas opções de terapias para a CBM, isoladas e combinadas, que incluem métodos físicos e químicos. Entretanto, a eficácia destes tratamentos é muito variável, dependendo de diversos fatores: o agente etiológico, a severidade das lesões, os níveis de antifúngico no plasma e nos tecidos, a resistência aos antifúngicos e a adesão do paciente ao tratamento. Casos mais severos são extremamente difíceis de tratar devido à natureza recalcitrante da CBM (12). O agente etiológico é um fator importante no sucesso do tratamento, pois na prática clínica observa-se que lesões causadas por *C. carrionii* e *P.*

*verrucosa* respondem bem a doses mais baixas de antifúngico, enquanto lesões causadas por *F. pedrosoi* têm resposta variável e muitas vezes são mais difíceis de tratar (13).

Em relação à terapia farmacológica, o antifúngico mais utilizado é o itraconazol (ITC) (**Figura 9**). A dose diária que apresenta bons resultados é de 200 a 400 mg e o tempo de tratamento ideal é de oito a dez meses, porém varia bastante (14). O ITC é um antifúngico triazólico que, assim como os outros azóis, inibe a enzima 14 $\alpha$ -desmetilase, que é responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol. O ergosterol é um componente fundamental da membrana celular fúngica e, na falta deste, ela fica mais permeável, levando à lise da célula e morte. O ITC é ativo contra a maior parte dos fungos patogênicos humanos e possui efeitos adversos limitados (102,103). Apesar destas qualidades, a taxa de cura de pacientes com CBM tratados com itraconazol varia de 15 a 80% e alguns casos são refratários a esse antifúngico (1,104). A terbinafina (TRB) é o outro antifúngico mais utilizado no tratamento da CBM. A TRB é uma alilamina que bloqueia a síntese do lanosterol e possui taxas de cura semelhantes às do ITC. As doses diárias utilizadas vão de 250 a 500 mg e o tempo de tratamento pode variar de 6 a 12 meses. Algumas vezes, ITC e TRB são utilizados em conjunto, principalmente em casos recidivos (13,105).



**Figura 9.** Fórmula estrutural do itraconazol.

Fonte: A autoria própria.

Em casos resistentes aos antifúngicos mais utilizados, uma alternativa é o voriconazol (VRZ) que, apesar de não ter resultados tão bons *in vitro*, se mostra efetivo na prática clínica (106–108). Recentemente, novos azóis como luliconazol, lanoconazol e efinaconazol foram testados e apresentaram boa atividade *in vitro*, sendo candidatos promissores para o tratamento de infecções causadas por fungos melanizados, apresentando menos efeitos

colaterais e substituindo o uso de antifúngicos que apresentam resistência (26). Apesar de existirem atualmente diversas opções de antifúngicos para o tratamento da CBM, um dos problemas recorrentes a todos eles é o custo muito elevado, considerando que essa doença atinge as populações mais pobres do mundo (13). Além disso, muitos medicamentos não estão disponíveis em diversos países. Outro problema do uso de antifúngicos é a toxicidade que estes apresentam em tratamentos longos com altas doses (especialmente em pacientes imunocomprometidos), além da possibilidade do desenvolvimento de resistência caso o tratamento não seja seguido corretamente.

Frente a esses problemas existem alternativas de tratamento para a CBM, como os métodos físicos, que podem ser utilizados em conjunto com antifúngicos. Estes métodos incluem a cirurgia convencional, a crioterapia, a termoterapia, a terapia com laser e, mais recentemente, a terapia fotodinâmica (105). Entre estes, a cirurgia é o método mais recomendado para a CBM, porém ela é geralmente limitada para lesões iniciais e demarcadas. Podem ser utilizados antifúngicos antes, para reduzir o tamanho das lesões e possibilitar a cirurgia, e depois, para reduzir o risco de recidivas. A cirurgia é recomendada para casos com no máximo 3 meses de evolução, entretanto existem relatos na literatura de lesões com 20 anos de evolução que foram reduzidas com uso de antifúngicos e, posteriormente, removidas cirurgicamente (105,109). A crioterapia e a termoterapia são tratamentos com efeitos colaterais mínimos e custo relativamente baixo, no entanto também são recomendadas para lesões pequenas e limitadas (6). A crioterapia utiliza nitrogênio líquido para estimular reações inflamatórias e necrose do tecido afetado e a termoterapia utiliza temperaturas entre 42°C e 46°C para inibir o crescimento do fungo (1,110,111). A terapia com laser é feita com um laser de CO<sub>2</sub> com alta precisão, dano tecidual reduzido e ausência de efeitos colaterais sistêmicos, além de custo reduzido. Entretanto, sua desvantagem é a efetividade também apenas para lesões muito bem delimitadas (1). Por fim, a terapia fotodinâmica utiliza compostos não tóxicos sensíveis à luz, que quando expostos a uma determinada luz se transformam em compostos tóxicos para células malignas ou agentes infecciosos. Esse tipo de tipo de tratamento é minimamente invasivo e é utilizado primariamente em casos de câncer de pele, porém tem se mostrado efetivo para lesões da CBM (105,112–114).

A cura da CBM é definida pela resolução das lesões, que são substituídas por cicatrizes, e pelo fim da dor local e prurido. Deve haver ausência de células muriformes no exame micológico direto e ausência de crescimento do fungo no exame através de cultivo. Na histopatologia observa-se fibrose cicatricial com infiltrado crônico inflamatório, em

substituição ao infiltrado granulomatoso e abscessos; além disso, não devem ser observadas células muriformes nos cortes histológicos (6). Um período de acompanhamento de dois anos sem recidivas também é necessário para definir a cura clínica. A disponibilidade de novos antifúngicos com espectro de ação mais amplo melhorou o prognóstico dos pacientes com CBM. Entretanto, falhas nos tratamentos e recidivas ainda são comuns. Diversos fatores podem ser elencados, alguns dos quais foram discutidos anteriormente: diagnóstico errado ou tardio, severidade das lesões (diminui a biodisponibilidade dos fármacos), não adesão aos tratamentos, desenvolvimento de resistência aos antifúngicos, dificuldade em erradicar as células muriformes, falta de estudos clínicos comparativos e, principalmente, pouco interesse e incentivo na pesquisa de novos e melhores alvos terapêuticos (1).

## **2.2 Ensaios de suscetibilidade aos antifúngicos**

### **2.2.1 Aspectos gerais**

Os ensaios de suscetibilidade *in vitro* possuem como principal objetivo a escolha do melhor fármaco para tratar uma doença causada por determinado isolado fúngico. Além disso, através desses ensaios é possível identificar cepas resistentes, contribuindo para aumentar o conhecimento sobre este problema crescente na micologia médica (15). Para infecções invasivas, que estão associadas à alta mortalidade, as opções de tratamento são apenas os antifúngicos azólicos e poliênicos, as equinocandinas e a flucitosina, existindo, portanto, poucas classes de antifúngicos disponíveis, o que pode ocasionar o surgimento de resistência. Um dos maiores desafios é a emergente resistência a múltiplas classes, problema recorrente em algumas espécies do gênero *Candida*. Portanto, é essencial o uso adequado e direcionado dos antifúngicos para preservar a efetividade desses fármacos (16). Isso demonstra a importância crescente dos ensaios de suscetibilidade *in vitro*. A atividade antifúngica é medida nestes ensaios através da concentração inibitória mínima (CIM). A CIM é a concentração mínima do fármaco necessária para inibir o crescimento do fungo (17).

O primeiro método padronizado para ensaios de suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro* foi desenvolvido apenas em 1997 pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), atualmente *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). O protocolo M27A recebeu o nome de “*Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard*” e é específico para fungos

leveduriformes como os do gênero *Candida* e *Cryptococcus*. Portanto, na época, estudos que avaliavam fungos filamentosos utilizavam adaptações do método, o que gerava dados conflituosos e que não podiam ser comparados. Apenas em 2002 foi desenvolvido o primeiro protocolo para fungos filamentosos: o M38A – “*Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard*”. Este protocolo teve sua terceira edição lançada em 2017 e essa é a versão atualmente aceita para ensaios de suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro* com fungos filamentosos (15,115).

Outro protocolo padrão para ensaios de suscetibilidade é o EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), que apresenta resultados comparáveis aos do CLSI para todas as classes de antifúngicos. Ambos os protocolos utilizam a técnica de microdiluição em caldo (MDC) para determinação das CIMs (17). As CIMs são avaliadas através de pontos de corte que determinam se o fármaco é ou não eficaz contra determinado isolado fúngico. Os pontos de corte classificam os fungos em três categorias: suscetíveis – o fármaco testado é indicado para o tratamento; intermediários – o fármaco testado é indicado para o tratamento dependendo de algumas condições; e resistentes – o fármaco testado não é indicado para o tratamento. A determinação dos pontos de corte é um processo complexo que envolve diversos fatores, combinando dados de ensaios *in vitro*, *in vivo* e dados clínicos (15,116). Tanto o CLSI como o EUCAST possuem pontos de corte definidos apenas para algumas espécies de fungos, principalmente do gênero *Candida*. Não existem pontos de corte específicos para nenhum fungo filamentoso no CLSI (no EUCAST há para algumas espécies do gênero *Aspergillus*), portanto, para estes são usadas apenas aproximações. Em geral, uma CIM menor ou igual que 1 µg/mL é usada como indicativo de suscetibilidade para a maior parte dos antifúngicos utilizados no tratamento de doenças causadas por fungos dematiáceos (115).

Apesar de indicarem a suscetibilidade ou resistência de um isolado fúngico, os resultados desses testes devem ser interpretados com cautela, pois não há uma associação absoluta e direta entre a CIM determinada *in vitro* e a resposta clínica ao antifúngico (17). Entre os fatores que contribuem para isso, pode-se citar que a resposta do paciente ao tratamento não depende apenas da atividade antifúngica intrínseca, mas também do perfil farmacológico e das características próprias de cada caso. Além disso, em ensaios de suscetibilidade *in vitro* para agentes da CBM são utilizados esporos e hifas, e não as células muriformes, que sabidamente são mais resistentes e podem responder de maneira diferente aos antifúngicos (1). Entretanto, quando os ensaios são realizados de forma correta e

reprodutível e seus resultados são interpretados com cautela, eles podem fornecer dados importantes sobre suscetibilidade e resistência que auxiliam no manejo da doença e prognóstico do paciente (115). De fato, verifica-se que vem ocorrendo um esforço para que os resultados dos ensaios de suscetibilidade *in vitro* possam ser relacionados com os desfechos clínicos, tornando eles uma ferramenta útil para a prática clínica e os destacando como uma das tarefas mais importantes realizadas em laboratórios de microbiologia clínica (17,117).

### 2.2.2 Métodos comerciais convencionais

Os dois métodos de referência para ensaios de suscetibilidade mencionados anteriormente, padronizados pelo CLSI e EUCAST, não são voltados para utilização rotineira em laboratórios clínicos, possuem alta complexidade e demandam um longo tempo de trabalho. Existem diversos testes comerciais, adaptados a partir dos métodos de referência, disponíveis para utilização na rotina laboratorial (18). Os testes comerciais podem ser divididos em dois tipos: os que utilizam a técnica de microdiluição em caldo e os em ágar. A escolha do teste comercial adequado deve levar em consideração a correlação dos resultados (CIMs) deste com os resultados dos métodos de referência. Além disso, o teste deve ser realizado seguindo rigorosamente as orientações do fabricante para obtenção de resultados confiáveis (15).

Entre os métodos que utilizam a técnica de microdiluição em caldo, pode-se citar: Sensititre® YeastOne® (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), SensiQuattro *Candida* EU® (bestbiondx, Germany) e Vitek® 2 Yeast Susceptibility System (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Os dois primeiros são métodos colorimétricos nos quais a suscetibilidade dos isolados é avaliada com base no crescimento ou inibição no meio de cultura contendo um determinado antifúngico. Através de alteração de cores é possível verificar se o fungo cresceu ou não. O Vitek® 2 é um sistema automatizado de identificação de leveduras e teste de suscetibilidade a partir do crescimento fúngico. Ele integra um *software* que interpreta e gera os resultados de suscetibilidade ou resistência com base nas CIMs (15). Entre os métodos comerciais que são baseados em ágar, o Etest® (AB Biodisk, Solna, Sweden) é o mais utilizado. Neste método simples, uma tira de plástico impregnada com um gradiente de concentração de determinado antifúngico é aplicada na superfície do ágar inoculado. A leitura da CIM é realizada diretamente na escala da tira onde o halo de inibição a intercepta (15,18).

As CIMs determinadas pelos métodos comerciais em geral apresentam alta correlação com aquelas determinadas pelos métodos de referência (CLSI e EUCAST). No entanto, para algumas classes de antifúngicos, como as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina), a correlação é mais baixa. Os trabalhos que avaliam a correlação das CIMs dos métodos comerciais com os métodos de referência são em sua maior parte voltados apenas para espécies dos gêneros *Candida* e *Aspergillus* (118–123).

Apesar dos métodos comerciais serem amplamente utilizados na rotina de laboratórios de Microbiologia, eles também apresentam algumas limitações. Para alguns antifúngicos, como a caspofungina, ocorre uma variabilidade interlaboratorial na determinação das CIMs, o que nesses casos limita a utilização dos testes para suscetibilidade *in vitro*. A possível subjetividade na leitura das CIMs também pode levar a resultados não confiáveis e não reprodutíveis. É importante destacar também que os métodos comerciais são desenvolvidos primariamente para leveduras. Alguns trabalhos já compararam o Etest® com o protocolo do CLSI para fungos filamentosos, no entanto a maior parte estudou apenas algumas espécies de *Aspergillus*. É necessária uma maior validação para que o Etest® possa ser de fato recomendado para ensaios de suscetibilidade de fungos filamentosos (124). Dessa forma, na maior parte dos estudos com esses fungos, os ensaios são feitos seguindo os métodos de referência como os protocolos M38 do CLSI (26–29). Por fim, ressalta-se que tanto os métodos de referência como os testes comerciais apresentam um custo elevado, o que é um fator importante a ser considerado na realidade brasileira.

### **2.2.3 Novos métodos não-convencionais**

Frente às limitações dos métodos convencionais discutidas anteriormente, nos últimos anos novas metodologias para ensaios de suscetibilidade *in vitro* vêm sendo desenvolvidas. Uma das que se destacam é a técnica MALDI-TOF: ionização e dessorção a laser assistida por matriz (em inglês, *matrix assisted laser desorption ionization* - MALDI) com analisador de tempo de voo (em inglês, *time of flight* - TOF). MALDI-TOF é uma técnica de espectrometria de massa que separa as moléculas através das diferenças na razão massa/carga. Espectros característicos de proteínas são obtidos a partir de células intactas, o que permite a identificação de micro-organismos, uma das principais aplicações da técnica nos laboratórios de Microbiologia (125).



Recentemente, a técnica MALDI-TOF passou a ser proposta para testes de suscetibilidade *in vitro* (118,126,127), uma vez que a exposição a antifúngicos induz alterações na expressão de proteínas e consequentemente no espectro de massa (125). Dessa forma, os isolados devem ser incubados previamente com os antifúngicos a serem testados. Nessa técnica, ao invés da CIM, é determinada a concentração mínima de mudança de perfil ou MPCC (do inglês *minimal profile change concentration*). A MPCC é a concentração mínima do fármaco na qual é detectada uma alteração no perfil do espectro de massa. Ela possui alta correlação com as CIMs determinadas através dos métodos de referência (19). As principais vantagens da técnica em relação aos métodos convencionais é a maior rapidez para obtenção dos resultados e a eliminação de possíveis leituras subjetivas das CIMs, um problema relativamente comum nos testes com fungos filamentosos (18). Como limitações pode-se citar que esta técnica depende da existência de um banco de dados com mecanismos de resistência conhecidos, além de que proteínas mutantes que apresentam peso molecular semelhante a outras proteínas celulares podem não ser identificadas (23). Há também o alto custo inicial para adquirir o equipamento (aproximadamente 200 mil euros) e o valor das manutenções anuais (aproximadamente 20 mil euros). Seu custo-benefício deve ser sempre avaliado antes da implementação da metodologia em laboratórios (128).

Outra metodologia tem sido utilizada nos últimos anos é a detecção de resistência a antifúngicos através de métodos moleculares. A identificação de micro-organismos com uso destes métodos já está bem estabelecida e, a partir disso, começaram a ser desenvolvidos estudos com o objetivo de determinar isolados resistentes. Isso é feito através da detecção de mutações importantes que provavelmente resultam em resistência a determinados fármacos. Dessa forma, além do micro-organismo ser identificado, é possível ao mesmo tempo verificar seu perfil de mutações que podem levar à resistência clínica (129). No entanto, para isso, é preciso que sejam conhecidas previamente essas mutações. Além disso, a resistência para alguns antifúngicos não é causada por apenas uma mutação, mas sim por uma complexidade de fatores. Por exemplo, os métodos moleculares são muito efetivos para detectar a resistência de espécies do gênero *Candida* a equinocandinas, enquanto para a resistência a antifúngicos azólicos eles não são indicados (19). Assim, apesar de muito promissora, a detecção de micro-organismos resistentes por meio de métodos moleculares ainda está longe de ser integrada na rotina de laboratórios, devido à falta de padronização e da necessidade de conhecer melhor as mutações que se convertem em resistência clínica (18).

#### 2.2.4 Uso de FTIR para ensaios de suscetibilidade

Outro método não-convencional que pode ser utilizado para testes de suscetibilidade é a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A técnica de FTIR está fundamentada na interação das ligações químicas presentes nos compostos de uma amostra com a radiação infravermelha, gerando espectros que contêm a “impressão digital” da amostra. Dessa forma, as estruturas químicas presentes podem ser estudadas qualitativamente e quantitativamente e esta metodologia pode ser aplicada para qualquer tipo de composto (20). A técnica de FTIR tem aplicações muito amplas e é utilizada em diversas áreas, como ciência dos materiais, pesquisa forense, bioquímica, ciências biomédicas, geoquímica, medicina, entre outras (24). Na medicina, suas aplicações vão desde o diagnóstico de diversas doenças (câncer, doenças neurológicas, diabetes, aterosclerose, doenças infecciosas, entre outras) até a substituição de exames cujas metodologias padrão são mais complexas (20).

As principais vantagens de FTIR são: uso de uma quantidade muito pequena de amostra, sua preservação durante a análise e a necessidade mínima de preparação; pouca ou nenhuma geração de resíduos; rapidez da análise; precisão e reprodutibilidade; e armazenamento e manipulação dos dados de maneira diretamente computadorizada. Sua principal limitação é a baixa resolução espacial no ponto de foco, necessitando assim de uma amostra de tamanho minimamente na ordem de milímetros (21). Para permitir a análise de amostras ainda menores existe a microespectroscopia no infravermelho, uma variante da técnica de FTIR. Nessa metodologia, o espectrômetro é acoplado a um microscópio óptico específico para esse tipo de análise, o que permite a obtenção de espectros com alta qualidade a partir de uma amostra muito menor que na técnica de FTIR convencional. Isso é especialmente interessante na área microbiológica, pois permite a obtenção de resultados com um tempo de cultivo muito menor (130).

Especificamente na área microbiológica, a técnica de FTIR aliada a análises estatísticas multivariadas é utilizada de maneira muito eficiente e estabelecida na identificação de micro-organismos (130). As biomoléculas presentes nas células geram espectros característicos, que dão informações estruturais e funcionais detalhadas sobre a composição celular microbiana, possibilitando a sua diferenciação e identificação (24). Dessa forma, a técnica de FTIR permite monitorar alterações bioquímicas e moleculares muito sutis nas células da amostra microbiana analisada, oportunizando o estudo de seu metabolismo (25). Considerando que a suscetibilidade de um microrganismo a um fármaco é manifestada nestas

alterações sutis, a técnica de FTIR pode ser proposta como uma metodologia para determinação da suscetibilidade ou resistência de micro-organismos a agentes antimicrobianos.

Existem poucos estudos na literatura que avaliaram a utilização de FTIR com esse enfoque. Em 1997, foi realizado o primeiro estudo que mostrou ser possível discriminar micro-organismos sensíveis e resistentes a determinado fármaco através de FTIR com reflexão total atenuada (ATR-FTIR) e tratamentos estatísticos dos espectros. Neste trabalho, foi estudada a resistência de quatro isolados de *Pseudomonas aeruginosa* ao antibiótico imipenem e foi possível distinguir os isolados sensíveis e resistentes a partir da análise dos espectros. Eles concluíram o estudo afirmando que “a técnica de FTIR examina a composição total de um determinado organismo em um único experimento e pode rapidamente orientar investigações no campo do diagnóstico de resistência bacteriana” (131). Apesar de terem obtido bons resultados, o número de isolados testados no estudo foi extremamente baixo (apenas quatro), não sendo possível validar a metodologia utilizada.

Apenas em 2013 Lechowicz e colaboradores avaliaram a possibilidade de usar ATR-FTIR para detectar a suscetibilidade de 109 isolados uropatogênicos de *Escherichia coli* à cefalotina. Como há diversos mecanismos envolvidos na resistência bacteriana e essas características ficam dispersas por todo o espectro, os autores afirmaram que o uso de métodos matemáticos como a Análise de Componentes Principais (PCA), que foi a análise utilizada no estudo citado anteriormente, pode gerar resultados incorretos pela falta da validação necessária. Dessa forma, foi proposta a utilização de redes neurais artificiais, um método matemático avançado que foi utilizado para classificar os isolados em dois grupos: sensíveis ou resistentes à cefalotina. Para os isolados sensíveis o número de classificações corretas foi 92,23% e para os resistentes foi de 91,9%, o que os autores consideraram um bom resultado (22).

Em 2014, Pomerantz e colaboradores utilizaram FTIR para classificar o fungo fitopatogênico *Phytophthora infestans* como sensível ou resistente ao fungicida mefenoxam. Neste trabalho foram estudados cinco isolados do fungo, para os quais foram medidos 504 espectros no total. Foi possível classificar os fungos com 88% de sensibilidade e 95% de especificidade utilizando PCA seguido de análise discriminante linear (LDA) com validação cruzada *leave-one-out* (132). Porém, para obter esses resultados, foram utilizados os espectros médios das amostras: 20 espectros médios de 3 isolados resistentes e 17 espectros médios de 2 isolados sensíveis, com 37 espectros médios no total. Apesar do frequente uso de FTIR em

pesquisas de fungos fitopatogênicos, esse foi o primeiro trabalho a usar a técnica para classificá-los de acordo com sua resistência aos fungicidas utilizados rotineiramente.

O mesmo grupo publicou três estudos recentes (um no ano de 2019 e dois no ano de 2017) que tiveram como objetivo a detecção de isolados de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos utilizando a microespectroscopia no infravermelho combinada com algoritmos de análise multivariada (23–25). O estudo mais abrangente foi o publicado no ano de 2019, no qual foram analisados 791 isolados clínicos de *E. coli*. Estes isolados foram identificados e tiveram seus perfis de suscetibilidade definidos com uso de MALDI-TOF. Após, a partir da primeira cultura, foram analisados com microespectroscopia no infravermelho. Os autores utilizaram métodos computacionais avançados como as máquinas de vetores de suporte (*support vector machines* – SVM) para fazer o pré-tratamento dos espectros e classificá-los em sensíveis ou resistentes para determinado antibiótico, baseado nas suscetibilidades dos isolados. Foi possível determinar o antibiótico ideal para cada isolado com sensibilidade superior a 89%. A classificação foi desenvolvida através de pequenas diferenças presentes nos espectros devido às mutações que levam determinados isolados a desenvolver resistência. Como essas alterações são muito sutis, é necessário o uso de análises estatísticas multivariadas para classificar corretamente os espectros. Os autores concluíram que a microespectroscopia no infravermelho combinada com algoritmos de reconhecimento de padrões é uma ferramenta poderosa para determinar a suscetibilidade de isolados de *E. coli* para os antibióticos mais utilizados na prática clínica. Em aproximadamente 30 minutos (após a primeira cultura) é possível definir qual é o antibiótico de melhor escolha (23).

Apesar de ser uma metodologia promissora, há uma escassez na literatura de trabalhos que utilizaram FTIR como técnica em estudos de suscetibilidade a antimicrobianos. Os estudos realizados foram apenas com antibacterianos, não sendo encontrado nenhum que tenha avaliado algum antifúngico e/ou fungo filamentosos. Utilizar essa metodologia para esse tipo de fungo é muito promissor, uma vez que ela apresenta inúmeras vantagens em relação ao protocolo padrão do CLSI, principalmente no que se refere aos custos, mão de obra e geração de resíduos.

### **2.2.5 Ensaios de suscetibilidade com agentes da CBM**

Não existem ensaios clínicos randomizados para o tratamento da CBM e a eficácia dos antifúngicos é verificada principalmente através dos ensaios de suscetibilidade *in vitro*. Para

fungos filamentosos, a única metodologia de fato padronizada é através das versões do protocolo M38 do CLSI (M38-P, M38-A e M38-A2). Porém, para agentes da CBM, estes protocolos de referência ainda não estão padronizados. Além disso, como foi mencionado anteriormente, eles não são voltados para a utilização rotineira porque possuem alta complexidade, exigindo infraestrutura laboratorial adequada e recursos humanos qualificados, além de demandarem um longo tempo de trabalho (18). No caso específico dos agentes da CBM, a obtenção dos resultados leva no mínimo 12 dias (27), porém pode chegar até 20 dias dependendo do crescimento do fungo. Ademais, os insumos para esse tipo de protocolo possuem custo elevado, tanto em relação ao meio de cultivo (RPMI 1640-MOPS, com valor aproximado de R\$ 300,00 o litro) como em relação aos antifúngicos (como exemplo, o itraconazol - Sigma-Aldrich, Missouri, USA - tem o valor aproximado de R\$ 1.800,00 para 100 mg). Isso indica a necessidade de realizar estudos com outras metodologias para teste de suscetibilidade de fungos dematiáceos; não apenas para aplicação clínica, mas também em pesquisas para geração de dados epidemiológicos sobre resistência aos antifúngicos.

Nos estudos realizados, ITC e TRB apresentam bons resultados, possuindo concentração inibitória mínima menor que 1 µg/mL para praticamente todas as espécies causadoras da CBM, o que indica suscetibilidade dos fungos para esses fármacos (115). Entretanto, existem isolados resistentes, principalmente de *F. pedrosoi*, que exigem uma maior atenção na escolha do tratamento. Outros antifúngicos para os quais a maior parte dos agentes da CBM apresenta sensibilidade ou sensibilidade intermediária são o posaconazol (PSZ), o isavuconazol (ISZ), o ravuconazol (RVZ) e o cetoconazol (KET) (2). A 5-fluorocitosina (5-FC), o fluconazol (FLU) e as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina), em geral, não são efetivos contra os agentes da CBM, quando utilizados isoladamente. Entretanto, combinações como TRB + VRZ e ITC + caspofungina mostram 100% de sinergismo contra algumas espécies causadores da CBM (108). Outra combinação que mostra bons resultados é a de TRB e anfotericina B (AMB), apresentando efeitos sinérgicos contra a maior parte dos agentes da CBM (133).

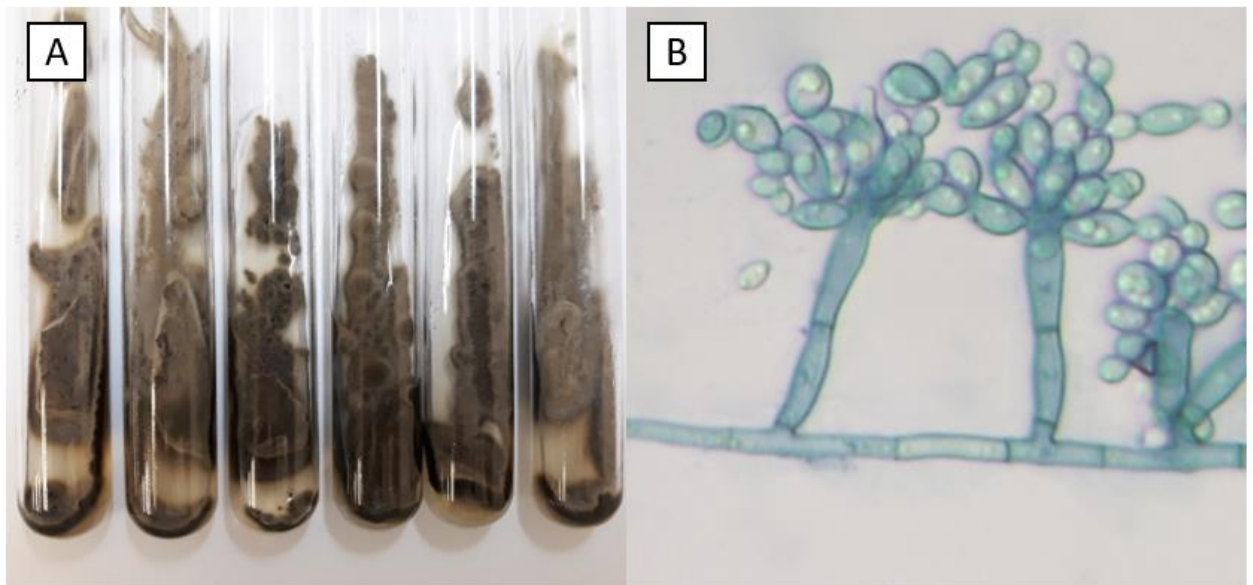
## **2.3 *Fonsecaea pedrosoi***

### **2.3.1 Aspectos gerais**

A espécie *F. pedrosoi* é o principal agente etiológico da cromoblastomicose em regiões tropicais incluindo o Brasil (64). Na natureza, é encontrada no solo, plantas e madeira em decomposição, assim como outros fungos dematiáceos. Em meio de cultivo, possui crescimento lento e apresenta colônias de textura aveludada e coloração verde-oliva a marrom (**Figura 7 e Figura 10A**). Produz hifas septadas e conidióforos eretos muito ramificados no ápice (**Figura 10B**). Os conídios são agrupados em dentículos e possuem forma de barril (**Figura 11**) (134).

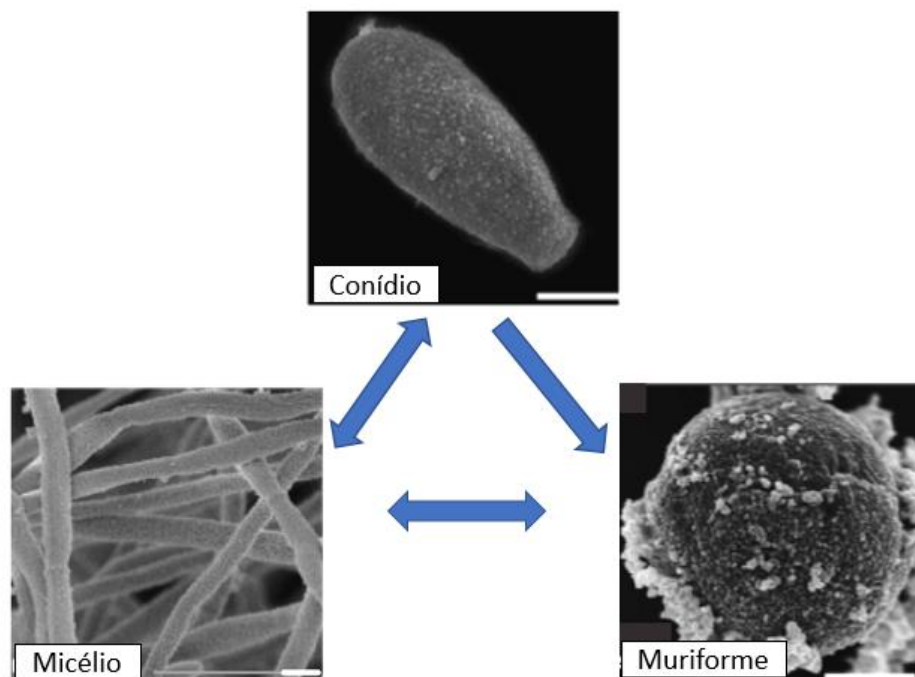
### 2.3.2 Diferenciação celular

*F. pedrosoi* é um fungo dimórfico que, em sua forma de vida saprofítica, apresenta micélio (forma filamentosa) e conídios (estruturas reprodutivas). Na forma parasítica, *F. pedrosoi* se diferencia em células muriformes, estruturas de resistência com paredes espessas pela deposição de melanina-DHN (**Figura 11**). Todas as formas do fungo podem originar as outras, exceto a transformação de células muriformes em conídios (134,135).



**Figura 10.** (A) Cultivo de *F. pedrosoi* em ágar batata dextrose (BDA) a 30°C durante 14 dias. (B) Microcultivo de *F. pedrosoi* com corante lactofenol azul de algodão (aumento aproximado de 400x).

Fonte: Autoria própria.



**Figura 11.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura das diferentes morfologias de *F. pedrosoi*. As setas indicam as possíveis formas de diferenciação. Barras de escala equivalentes a 1 µm.

Fonte: Adaptado de Santos et al. (134).

## 2.4 Melanina

### 2.4.1 Características e tipos

As melaninas são um grupo de pigmentos escuros encontrados nos seres vivos de todos os reinos biológicos. Elas não são essenciais para o crescimento e desenvolvimento, porém desempenham papéis importantes na sobrevivência e defesa (136). As melaninas compõem grupos diversos na sua origem metabólica, mas possuem propriedades semelhantes: são moléculas com alto peso molecular, muito estáveis, amorfas, carregadas negativamente, resistentes à degradação com ácidos, suscetíveis à degradação com bases fortes, hidrofóbicas e insolúveis em água e solventes orgânicos (137). São macromoléculas formadas pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos (30).

Os principais tipos de melaninas encontradas nos diferentes reinos biológicos são as eumelaninas, as feomelaninas, as piomelaninas, as alomelaninas e a neuromelanina. As

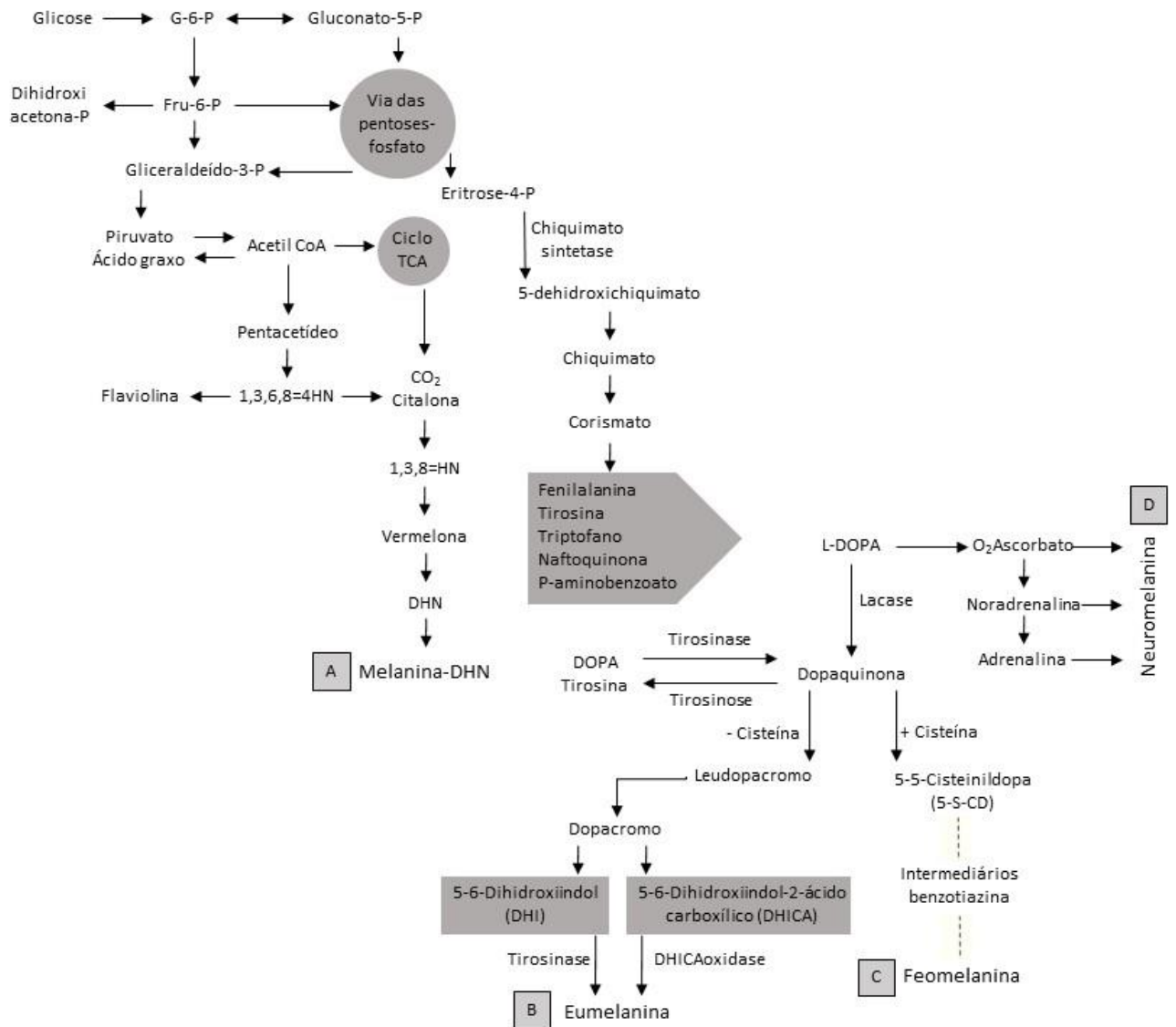
eumelaninas são derivadas da levodopa (3,4-di-hidroxi-L-fenilalanina) (L-DOPA) e possuem coloração negra; as feomelaninas incorporam cisteína com a L-DOPA e, portanto, possuem cor amarelada ou avermelhada; as piomelaninas são formadas por compostos do ácido homogentísico a partir de tirosinase e possuem coloração café; as alomelaninas são as melaninas de di-hidroxi-naftaleno (DHN), derivadas de acetatos na via dos pentacetídeos e são castanhas a negras; e a neuromelanina é produzida a partir de catecolaminas e encontrada na substância *nigra* e *locus ceruleus* de humanos, primatas e carnívoros (137,138) (**Figura 12**).

Em fungos, diversos tipos de melaninas já foram identificados. Os dois tipos mais importantes, que estão relacionados com patogenicidade, são a melanina-DHN (nome derivado do intermediário da via 1,8-di-hidroxi-naftaleno) e a melanina-DOPA (nome derivado do precursor L-3,4-di-hidroxifenilalanina) (30). Fungos patogênicos humanos que produzem precursores de melanina pela via da melanina-DHN incluem *Aspergillus nidulans*, *A. niger*, *Alternaria alternata* e todos os agentes da cromoblastomicose (139). Já a melanina derivada de L-DOPA é encontrada em apenas poucos fungos e sintetizada em uma via semelhante à da melanina nos mamíferos (140).

#### 2.4.1 Melanina-DHN e inibidores

A melanina fúngica mais bem caracterizada é a melanina-DHN, produzida por todos os agentes da CBM. É sintetizada em uma via conhecida como via dos pentacetídeos, que inclui pares alternados de reações de redução e desidratação. Esta via inicia com o 1,3,6,8-tri-hidroxi-naftaleno (THN), formado a partir de moléculas de acetato. O nome “pentacetídeos” vem do fato que a estrutura do anel de naftaleno, que é base da via da melanina-DHN, se forma pela união e ciclização de cinco subunidades de cetídeos originadas de cinco moléculas de acetato. O 1,3,6,8-THN é reduzido à citalona, uma etapa de desidratação forma o 1,3,8-THN, que é reduzido à vermelona e que, por fim, é desidratada em DHN, originando a melanina-DHN em uma etapa final de polimerização (136,141,142) (**Figura 13**). Esta via de biossíntese foi observada através de trabalhos que caracterizaram seus intermediários, que podem ser estudados quando acumulam pelo bloqueio de uma das etapas da via, o que ocorre por mutações ou pelo uso de inibidores. Estudos genéticos mostraram que a via da melanina-DHN é funcionalmente comparável em diferentes espécies de fungos (143).



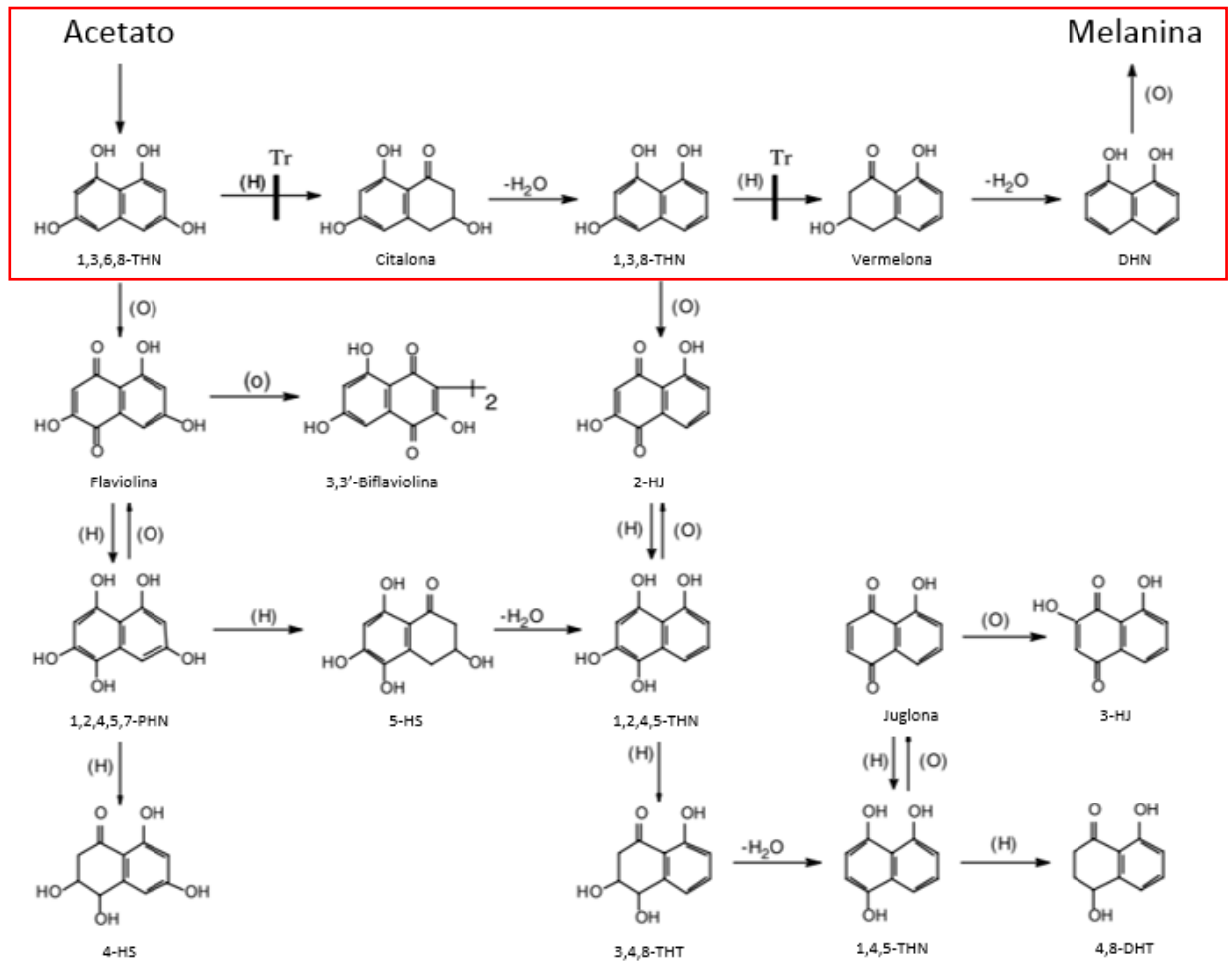


**Figura 12.** Vias metabólicas de formação das melaninas: melanina-DHN (A), eumelanina (B), feomelanina (C) e neuromelanina (D).

Fonte: Adaptado de Urán et al. (137).

Especificamente para *F. pedrosoi*, já foi caracterizada a melanina e seus melanossomos (144–146). Em 1991, Alviano e colaboradores evidenciaram que a melanina possivelmente é depositada em organelas intracelulares que aparecem como corpos eletrodensos quando observados por microscopia eletrônica de transmissão. Estes corpos desapareceram após extração alcalina com 0.5 M de NaOH, sugerindo que continham melanina. Em relação à composição química, as unidades glicosídicas detectadas foram ramnose, manose, glicose e galactose; os aminoácidos predominantes foram ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina, glicina e alanina; e a porção lipídica estava composta por ácidos

graxos saturados e insaturados, com cadeias de números pares de átomos de carbono (144). Posteriormente, em 1999, o mesmo grupo de pesquisa evidenciou que as etapas de formação dos melanossomos em *F. pedrosoi* são muito semelhantes às observadas em células de mamíferos. Também foram descritas todas as etapas, desde a formação até a fusão dos melanossomos com a membrana plasmática e deposição da melanina na parede celular (145).



**Figura 13.** Via de biossíntese da melanina-DHN (caixa em destaque) e metabólitos pentacetídeos associados (parte inferior). A linha superior evidencia a ação do triciclazol, inibindo a redução de 1,3,6,8-THN em citalona e de 1,3,8-THN em vermelona (seu efeito inibitório é maior nesta segunda redução).

Fonte: Adaptado de Kogej et al. (142).

Em 2008, Franzen e colaboradores mostraram a presença de fósforo, ferro e cálcio no interior dessas organelas em *F. pedrosoi*. Estes mesmos elementos foram encontrados na membrana celular, corroborando a hipótese de que os melanossomos se fundem com a

membrana plasmática, liberando seu conteúdo na parede celular. O ferro é um importante constituinte da melanina fúngica e o responsável pela proteção que esta fornece contra o estresse oxidativo. Já o cálcio, que também é acumulado em melanossomos de células animais, está relacionado com a diferenciação de hifas e conídios em células muriformes, a forma parasítica de *F. pedrosoi*. Esta influência ocorreria quando essa substância é liberada em conjunto com a melanina na parede celular (146). A importância do cálcio nessa transformação já foi verificada em estudos que produziram células muriformes *in vitro* (147,148).

Um inibidor da biossíntese de melanina-DHN é o 5-metil-1,2,4-triazol[3,4] benzotiazol (triciclazol). O triciclazol é um fungicida que foi desenvolvido há cerca de 40 anos para combater a brusone no arroz, uma doença distribuída mundialmente e muito destrutiva, responsável por perdas de 10 a 30% dos cultivos em diferentes países (149,150). Essa doença é causada pela espécie *Magnaporthe oryzae* e a infecção começa pelo contato e germinação dos conídios do fungo nas folhas do arroz. Após, é formado um apressório espessado pela deposição de melanina-DHN, que penetra a planta e produz hifas em seu interior, gerando lesões que levam à perda das lavouras de arroz (150). O triciclazol atua em duas etapas de redução na via de biossíntese da melanina-DHN, especificamente a de redução de 1,3,6,8-THN em citalona e de 1,3,8-THN em vermelona (**Figura 13**). Isso leva ao acúmulo de citalona, flaviolina, 2-hidroxiuglona e 3,3'-biflaviolina (151,152). Ao inibir a produção de melanina-DHN, o apressório perde seu poder de penetração devido à falta desse composto, evitando a infecção da planta (153).

Além do controle da brusone do arroz, o triciclazol também é utilizado em outras doenças causadas por fungos fitopatogênicos produtores de melanina-DHN, como a mancha-marrom na cevada (causada pelo fungo *Bipolaris sorokiniana*) e a podridão-mole no pêssigo (causada pelo fungo *Aspergillus aculeatus*) (154,155). Alguns estudos também observaram que o triciclazol age em outras vias biossintéticas além da melanina-DHN, inibindo a produção de aflatoxinas em *Aspergillus flavus* e de altersolanol A em *Alternaria solani*, dois fungos que afetam o cultivo e a produção de algumas plantas e seus derivados (156,157). Apesar de atuar na via de biossíntese da melanina-DHN e de outros compostos, o triciclazol não inibe o crescimento dos fungos, afetando primariamente a sua patogenicidade (158). Dessa forma, ele é utilizado em estudos *in vitro* para fins de inibição da melanina-DHN.

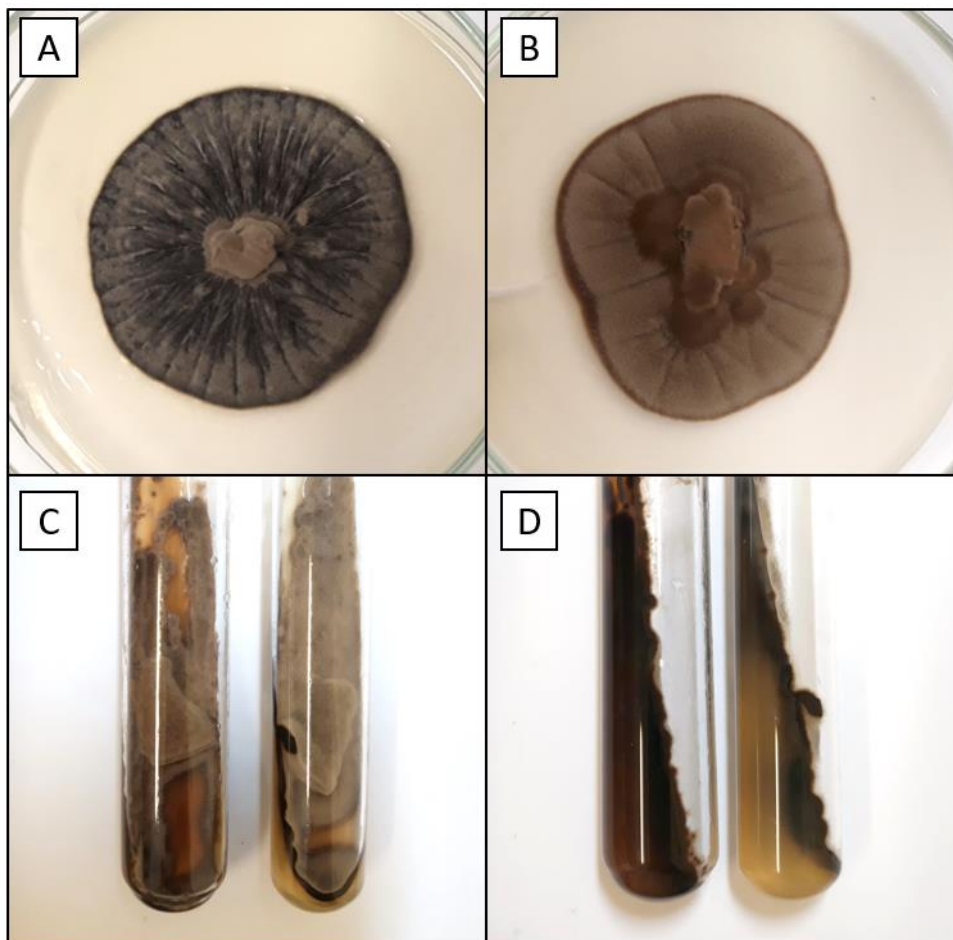
Em trabalhos com *F. pedrosoi*, o triciclazol é utilizado na concentração entre 16 µg/mL a 32 µg/mL (32–34). A presença de triciclazol no meio de cultivo muda a coloração

das colônias de verde-escuro, cinza ou preto (pela presença de melanina) para marrom-avermelhado, assim como o meio também passa a apresentar essa cor (pela acumulação dos metabólitos intermediários da via de biossíntese da melanina-DHN) (142) (**Figura 14**). Estes estudos são realizados principalmente para avaliar as funções que a melanina-DHN exerce nos agentes da cromoblastomicose e outros fungos.

#### **2.4.1 Funções das melaninas**

As melaninas são fundamentais para a sobrevivência de micro-organismos em ambientes hostis, protegendo contra temperaturas extremas, agentes oxidantes, radiação UV, radiação ionizante, estresse osmótico e degradação enzimática (159–162). Além disso, a melanina é um mecanismo de proteção contra a predação de outros micro-organismos existentes no solo, como amebas, por exemplo (163). Em um estudo com isolados albinos de *Fonsecaea monophora*, verificou-se que estes se tornaram mais sensíveis a condições extremas de pH, radiação UV e estresse oxidativo (164). No ano 2000, foi realizado um trabalho em que foram avaliados os fungos presentes nas estruturas do reator nuclear destruído no acidente de Chernobyl, no qual observou-se uma dominância de espécies produtoras de melanina nas áreas altamente contaminadas (165). De fato, dentre todos os micro-organismos que vivem em áreas extremas, uma maior proporção destes é produtor de algum tipo de melanina (136).

Na área médica, as funções de maior interesse da melanina são a sua virulência e a capacidade que ela dá aos micro-organismos de evadirem o sistema imune. A melanina é um importante fator de virulência em fungos devido a sua proteção contra oxidação e radioatividade e suas propriedades termoestáveis, paramagnéticas e capacidade de se ligar a metais (34). Ela é uma molécula imunologicamente ativa e pode modular a resposta imune do hospedeiro, bloqueando alguns dos mecanismos utilizados para superar a infecção (137). A melanina atua estabilizando radicais livres, aprisionando elétrons não pareados (139). Em um estudo de Heidrich e colaboradores, foram analisados 77 isolados de agentes da CBM, distribuídos em cinco gêneros diferentes. Nesse trabalho, foi verificado que a melanina conferiu proteção contra o estresse oxidativo em todos os isolados. Em geral, o grau de proteção foi proporcional à quantidade de melanina que cada espécie produz, no entanto é possível que existam outros fatores protetivos além desse composto (166).



**Figura 14.** (A e B) Cultivo de *F. pedrosoi* em ágar Sabouraud a 30°C por 21 dias, sem (A) e com (B) 16 µg/mL de triciclazol; (C e D) Cultivo de *F. pedrosoi* em ágar batata dextrosado a 30°C por 14 dias – tubos da esquerda em cada foto suplementados com 16 µg/mL de triciclazol e tubos da direita em cada foto sem triciclazol.

Fonte: Autoria própria.

A melanina de *F. pedrosoi* reduz o ferro férrico para ferroso, formando um complexo ferro-melanina que funciona como um tampão redox para capturar radicais oxidativos. Dessa forma, protege o fungo contra a ação dos macrófagos ativadas. A melanina depositada na parede celular do fungo também mascara os antígenos ali presentes, produzindo um efeito evasivo do sistema imunológico do hospedeiro (34). Além disso, a melanina inibe a produção de óxido nítrico (NO), reduzindo *in vitro* a expressão do gene da óxido nítrico sintase (167). Durante a infecção por *F. pedrosoi*, em testes *in vivo* e *in vitro*, ocorreu uma inibição da produção de NO pelos macrófagos (168). De fato, a inibição da produção de melanina com uso de triciclazol aumenta a susceptibilidade de *F. pedrosoi* à ação dos macrófagos (32). A mesma ação da melanina é encontrada em outras espécies de fungos patogênicos, como

*Aspergillus fumigatus* e *Paracoccidioides brasiliensis* (169,170). Além destas funções, as melaninas têm relação com fármacos e especificamente antifúngicos, podendo modificar a ação destes se ligando a eles, oferecendo efeito protetor contra seu uso.

#### **2.4.2 Relação das melaninas com antifúngicos**

As melaninas são polímeros complexos que possuem muitos grupos carboxílicos (-COOH) em sua estrutura, o que permite ligações estáveis com diferentes compostos (171). Elas podem se ligar a muitos tipos de fármacos e químicos como aminas orgânicas, metais e hidrocarbonetos policíclicos, incluindo herbicidas, corantes, alcaloides, metais, entre outros. O número de fármacos que possuem afinidade com melanina é muito grande, incluindo fármacos psicotrópicos como fenotiazinas e outros antidepressivos neurolépticos e tricíclicos, fármacos para artrite reumatoide e malária (cloroquina), anestésicos locais e antibióticos aminoglicosídeos (172).

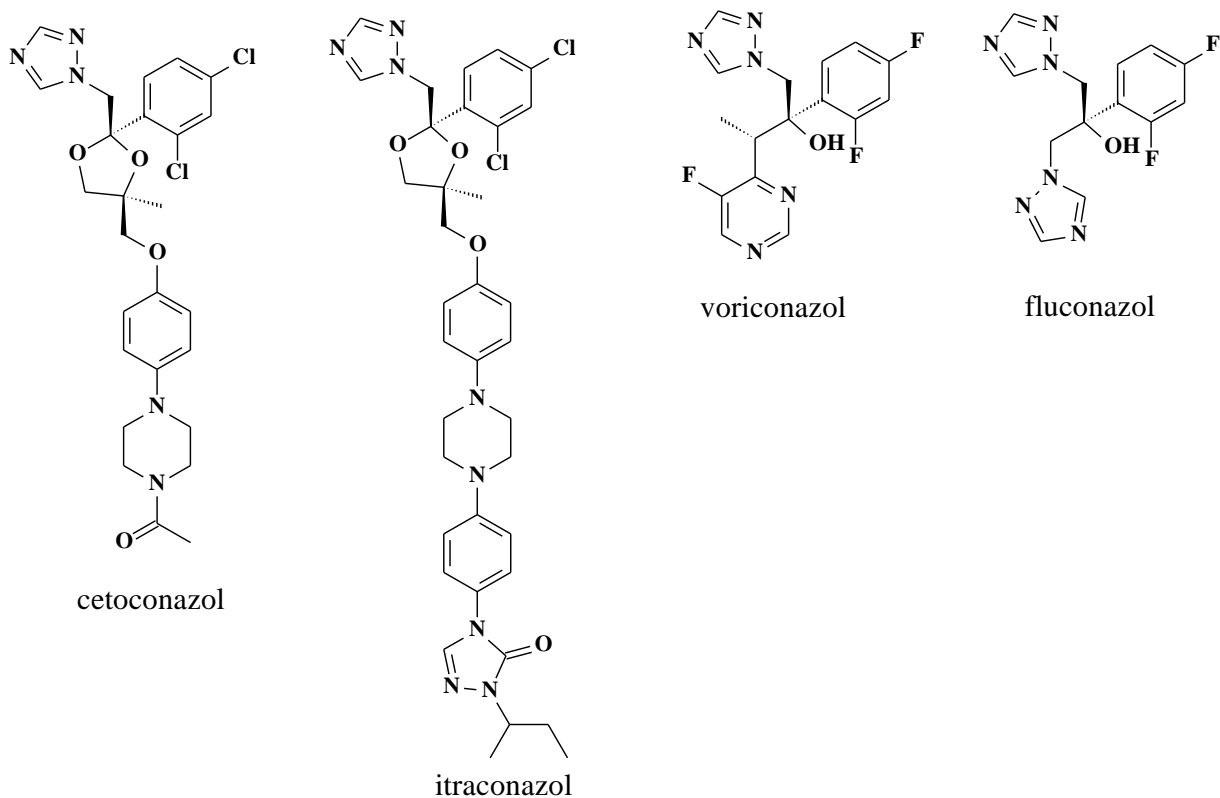
Em relação aos antifúngicos, a melanina é considerada um “fator de resistência antifúngica”, devido a sua capacidade de reduzir a suscetibilidade de células melanizadas a esses fármacos (31). van Duin e colaboradores relataram a ligação de DOPA-melanina com anfotericina B e caspofungina (173). Neste estudo, os antifúngicos foram incubados com melanina extraída de *Cryptococcus neoformans* ou melanina sintética e, ao serem testados contra *C. neoformans* e *Histoplasma capsulatum*, apresentaram CIMs significativamente maiores em comparação com os ensaios nos quais os antifúngicos não foram incubados com a melanina. O mesmo não foi observado para fluconazol, itraconazol e 5FC, cujas CIMs não apresentaram alteração ao serem pré-incubados. Foi demonstrada a possível ligação de anfotericina B e caspofungina com a DOPA-melanina, o que foi comprovado pela análise das melaninas após a incubação. Elas apresentaram mudanças significativas na sua área de superfície e distribuição de epítomos, cargas e razão C:N, mostrando que houve uma ligação. Para os outros fármacos testados (fluconazol, itraconazol e 5FC) não houve evidência de ligação com a melanina. Dessa forma, a melanina depositada na parede celular aparentemente “captura” determinados antifúngicos, impedindo-os de chegar em seus sítios alvo e, conseqüentemente, diminuindo sua atividade. Outros trabalhos também tiveram resultados semelhantes, nos quais células melanizadas de *C. neoformans* foram mais resistentes à anfotericina B em relação a células não melanizadas (174,175).

Em estudos com outros fungos produtores de melanina, como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii*, *Sporothrix brasiliensis* e *S. schenckii* também foi verificado que a deposição desse composto na parede celular confere proteção a diversos antifúngicos (170,176–178). Entretanto, o mecanismo pelo qual ocorre essa proteção não é totalmente compreendido, uma vez que nem todos os antifúngicos parecem se ligar à melanina e para muitos deles esse mecanismo ainda não foi estudado. Em relação ao itraconazol, os dados presentes na literatura são contraditórios. Em dois trabalhos, foi verificado que ele não possui nenhum tipo de ligação com a DOPA-melanina (35,173). Entretanto, no trabalho de Baltazar e colaboradores, que estudaram os efeitos da melanina em *P. brasiliensis*, foi encontrada uma pequena modificação no espectro do itraconazol incubado com a DOPA-melanina, mostrando a possibilidade de que há uma alteração no fármaco quando exposto a essa substância. No entanto, como é uma modificação pequena, os autores sugeriram que, em relação à DOPA-melanina, o principal mecanismo de redução da atividade do itraconazol se dá pelo bloqueio físico da sua entrada nas células fúngicas (171).

No entanto, para a melanina-DHN, que é o tipo de melanina produzida pelos agentes da cromoblastomicose, van de Sande e colaboradores verificaram sua ligação com o itraconazol e com o cetoconazol, mas não com os outros azóis fluconazol e voriconazol. Isso é explicado pela estrutura molecular destes antifúngicos, sendo que itraconazol e cetoconazol possuem estruturas semelhantes e diferem consideravelmente do fluconazol e do voriconazol. A interação da melanina-DHN com ITC e KET é provavelmente mediada pelo anel diclorobenzeno, pela longa cadeia lateral poliaromática ou por uma combinação de ambos (**Figura 15**). A ligação desses antifúngicos com a melanina reduz sua atividade *in vitro*, diminuindo sua disponibilidade para se ligar nos sítios de ação no fungo. Entretanto, estes resultados não podem ser transpostos para a atividade *in vivo*, sendo necessários mais estudos para compreender a ação protetiva da melanina-DHN em condições fisiológicas (35).

Em relação às CIMs, van de Sande e colaboradores verificaram que, na presença de melanina, a CIM do itraconazol aumentou 16 vezes em relação ao teste sem adição de melanina e para o fluconazol esse valor foi 32 vezes maior (35). Resultado semelhante foi encontrado em outro trabalho em que foi estudado o efeito de diferentes antifúngicos em isolados melanizados e não melanizados de *Wangiella dermatidis*, que também sintetiza melanina-DHN. Neste estudo, dentre os fármacos testados, apenas com o itraconazol ocorreu uma redução da CIM nos isolados de *W. dermatidis* não melanizados (179). Entretanto, em outro estudo com *Fonsecaea monophora*, com dois isolados melanizados e dois isolados

albinos, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nas CIMs frente a oito antifúngicos diferentes, incluindo o itraconazol (164). Isso pode ser devido ao pequeno número de isolados estudados ou às diferenças nas metodologias utilizadas nos trabalhos. Portanto, reforça-se a necessidade de mais estudos que verifiquem de fato qual a relação da melanina com os antifúngicos, por quais mecanismos ela afeta a atividade desses fármacos e quais são os seus reais efeitos protetivos *in vivo*.

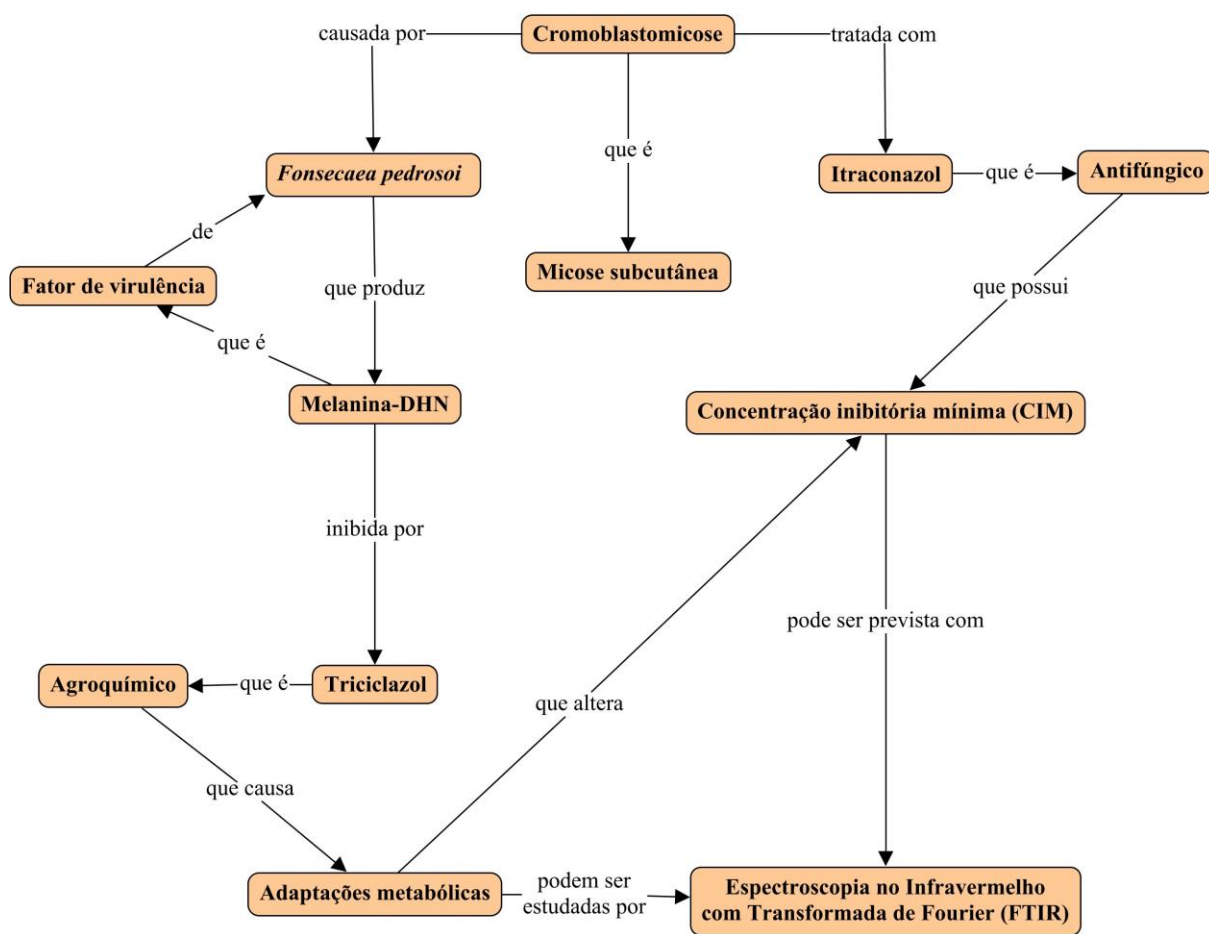


**Figura 15.** Estrutura molecular de antifúngicos azóis mostrando a similaridade entre cetoconazol e itraconazol, diferindo de voriconazol e fluconazol (que também são semelhantes).

Fonte: Adaptado de van de Sande et al. (35).



### 3 MARCO CONCEITUAL



**Figura 16** – Marco conceitual da pesquisa realizada.

Fonte: Autoria própria.

A figura acima mostra o marco conceitual da pesquisa realizada, organizado como um mapa conceitual que evidencia os elementos principais da pesquisa e como estes se relacionam entre si. Abaixo serão descritos brevemente cada conceito e suas relações.

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea cujo principal agente etiológico em regiões tropicais (incluindo o Brasil) é a espécie *Fonsecaea pedrosoi*. Este fungo dematiáceo produz melanina-DHN, que é o seu principal fator de virulência. A produção de melanina-DHN pode ser inibida *in vitro* com uso de triciclazol, que é um agroquímico utilizado para doenças em plantas causadas por fungos dematiáceos. A inibição da produção de melanina-DHN ocasiona adaptações metabólicas, além de sua presença ou

ausência alterar a resposta do fungo aos antifúngicos, uma vez que ela atua como fator protetor. Esses mecanismos podem ser estudados para compreender melhor a biologia dos fungos que causam a CBM e desenvolver recursos que os tornem mais suscetíveis. Uma metodologia eficiente para esse estudo é a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Outro fator importante em relação à cromoblastomicose é o seu tratamento, que muitas vezes é pouco efetivo devido à natureza recalcitrante da doença. Um dos principais antifúngicos utilizados é o itraconazol, cuja eficácia varia bastante, pois alguns isolados de fungos que causam a CBM apresentam resistência (problema comum em relação à espécie *F. pedrosoi*). Nesse sentido, é importante a realização de ensaios de suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro*, a fim de determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs), para identificar isolados resistentes e auxiliar na escolha do melhor tratamento. As CIMs podem ser determinadas através de metodologias convencionais, porém estes métodos apresentam limitações por serem muito laboriosos, terem custo elevado e levarem um tempo relativamente longo para obtenção dos resultados. Nesse sentido surgem novas metodologias, entre as quais se destaca a FTIR associada com análises quimiométricas, que permitem a criação de modelos de predição de CIMs robustos, pouco laboriosos, de baixo custo e com rapidez de resultados.

## 4 JUSTIFICATIVA

A espectroscopia no infravermelho representa uma metodologia simples e de baixo custo, sendo muito adequada para estudos na área médica e biológica. Além disso, este processo gera poucos resíduos e preserva a amostra, pois são necessários apenas miligramas ou até mesmo microgramas para cada ensaio. Portanto, sua utilização para substituir testes *in vitro* mais caros e complexos, como o teste padrão de suscetibilidade aos antifúngicos, é uma inovação tecnológica que garante o máximo de impacto, em relação à geração de dados significativos, com o mínimo de gastos financeiros. Considerando a atual situação do fomento da pesquisa no Brasil, é fundamental o desenvolvimento de metodologias acessíveis, possibilitando novas descobertas que tragam benefícios para a sociedade. A Agenda de Prioridades de Pesquisa do Ministério da Saúde, publicada em 2018, traz, dentro do seu eixo temático de número 6 – Doenças transmissíveis – a seguinte linha de pesquisa, pertinente com a presente justificativa (180):

6.1 Desenvolvimento e/ou avaliação de estratégias para a ampliação da atenção às doenças negligenciadas incluindo estratégias pertinentes ao contexto da avaliação, incorporação e monitoramento de tecnologias no SUS.

Além disso, utilizar FTIR para avaliar as adaptações metabólicas da espécie *F. pedrosoi* quando exposta a inibidores da biossíntese de melanina-DHN e antifúngicos, isolados e em conjunto, pode fornecer dados importantes acerca de um dos principais agentes da CBM. Sabendo-se que a melanina-DHN é o principal fator de virulência na CBM, esse conhecimento irá auxiliar na compreensão de como esta melanina atua na proteção do fungo e no desenvolvimento de mecanismos que o tornem mais suscetível. Isto poderá resultar em novos métodos de tratamento e condutas terapêuticas que impactem positivamente na qualidade de vida dos pacientes, uma vez que os tratamentos disponíveis atualmente muitas vezes não apresentam resultados satisfatórios.

Destaca-se por fim que este projeto faz parte de uma sequência de estudos que já foram ou estão sendo realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Fungos Patogênicos - UFRGS. Assim, ele dará continuidade a essa linha de pesquisa, garantindo a geração de novos dados que possibilitem um maior conhecimento da CBM e de seus agentes

etiológicos. Isso é muito relevante, pois, como já foi discutido, a CBM faz parte do grupo de doenças tropicais negligenciadas, que têm investimento reduzido em pesquisa e, dessa forma, são pouco estudadas.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo primário

Propor um modelo de ensaio de suscetibilidade ao itraconazol para *Fonsecaea pedrosoi* utilizando FTIR-ATR e análises quimiométricas.

### 5.2 Objetivos secundários

- Caracterizar morfotipos de cepas devidamente genotipadas de *F. pedrosoi* pela aquisição de impressões digitais metabólicas via FTIR-ATR;
- Avaliar, através de FTIR-ATR, as adaptações metabólicas das cepas em estudo de *F. pedrosoi* com uso de itraconazol e de triciclazol isolados e em conjunto;
- Avaliar a aplicabilidade de FTIR-ATR, em associação com algoritmos quimiométricos de análise exploratória e de análise de regressão multivariados, para quantificar os valores das CIMs do itraconazol e do triciclazol das cepas em estudo de *F. pedrosoi*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Queiroz-Telles F, de Hoog S, Santos DWCL, Salgado CG, Vicente VA, Bonifaz A, et al. Chromoblastomycosis. *Clin Microbiol. Rev* 2017; 30(1):233–76.
2. World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2010.
3. World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2013.
4. F. Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(11):e367–77.
5. Label M, Karayan LC, de Hoog S, Afeltra J, Bustamante T, Vitale RG. Differential distribution patterns of *Fonsecaea* agents of chromoblastomycosis, exemplified by the first case due to *F. monophora* from Argentina. *Med Mycol Case Rep.* 2018; 20:35–8.
6. de Brito AC, Bittencourt MJS. Chromoblastomycosis: an etiological, epidemiological, clinical, diagnostic, and treatment update. *An Bras Dermatol.* 2018; 93(4):495–506.
7. Queiroz-Telles F, Santos DWCL. Chromoblastomycosis in the clinical practice. *Curr Fungal Infect Rep.* 2012; 6(4):312–9.
8. Gomes NM, Bastos TC, Cruz KS, Francesconi F. Chromoblastomycosis: An exuberant case. *An Bras Dermatol.* 2014; 89(2):351–2.
9. Jamil A, Lee YY, Thevarajah S. Invasive squamous cell carcinoma arising from chromoblastomycosis. *Med Mycol.* 2012; (1):99–102.
10. Campos AGM, de Hollanda LE, Oliveira LM, do Valle FF, do Valle VAF. Squamous cell carcinoma arising from a chromomycosis lesion caused by *Rhinocladiella aquaspersa* with postsurgical recurrence of chromomycosis. *JAAD Case Reports.* 2018; 4(9):915–7.
11. Hoz RML, Baddley JW. Subcutaneous fungal infections. *Curr Infect Dis Rep.* 2012; 14(5):530–9.
12. Queiroz-Telles F, de Almeida BM, Breda G, de Matia G, Colombo AL. Therapeutic issues in patients with refractory chromoblastomycosis. *Mycoses.* 2012; 55:101–2.
13. Bonifaz A, Paredes-Solis V, Saul A. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. *Expert Opin Pharmacother.* 2004; 5(2):247–54.
14. Queiroz-Telles F, Purim KS, Fillus JN, Bordignon GF, Lameira RP, Cutsem JV et al. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. *Int J Dermatol.* 1992; 31(11):805–12.

15. Alastruey-Izquierdo A, Melhem MSC, Bonfietti LX, Rodriguez-Tudela JL. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015; 57(1):57–64.
16. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17(12):e383–92.
17. Sanguinetti M, Posteraro B. Susceptibility testing of fungi to antifungal drugs. *J Fungi*. 2018; 4(3):1–16.
18. Posteraro B, Sanguinetti M. The future of fungal susceptibility testing. *Future Microbiol*. 2014; 9(8):947–67.
19. Sanguinetti M, Posteraro B. New approaches for antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*. 2017; 23(12):931–4.
20. Balan V, Mihai C-T, Cojocaru F-D, Uritu C-M, Dodi G, Botezat D, et al. Vibrational spectroscopy fingerprinting in medicine: from molecular to clinical practice. *Materials*. 2019; 12(18):2884.
21. Bellisola G, Sorio C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am J Cancer Res*. 2012; 2(1):1–21.
22. Lechowicz Ł, Urbaniak M, Adamus-Białek W, Kaca W. The use of infrared spectroscopy and artificial neural networks for detection of uropathogenic *Escherichia coli* strains' susceptibility to cephalothin. *Acta Biochim Pol*. 2013; 60(4):713–8.
23. Sharaha U, Rodriguez-Diaz E, Sagi O, Riesenber K, Salman A, Bigio IJ, et al. Fast and reliable determination of *Escherichia coli* susceptibility to antibiotics: Infrared microscopy in tandem with machine learning algorithms. *J Biophotonics*. 2019; 12(7).
24. Salman A, Sharaha U, Rodriguez-Diaz E, Shufan E, Riesenber K, Bigio IJ, et al. Detection of antibiotic resistant: *Escherichia coli* bacteria using infrared microscopy and advanced multivariate analysis. *Analyst*. 2017; 142(12):2136–44.
25. Sharaha U, Rodriguez-Diaz E, Riesenber K, Bigio IJ, Huleihel M, Salman A. Using infrared spectroscopy and multivariate analysis to detect antibiotics' resistant *Escherichia coli* bacteria. *Anal Chem*. 2017; 89(17):8782–90.
26. Shookohi GR, Badali H, Mirhendi H, Ansari S, Rezaei-Matehkolaei A, Ahmadi B et al. In vitro activities of luliconazole, lanconazole, and efinaconazole compared with those of five antifungal drugs against melanized fungi and relatives. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(11):e00635-17.
27. Daboit TC, Magagnin CM, Heidrich D, Antochewis LC, Vigolo S, Meirelles LC et al. In vitro susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and to the combination of terbinafine and amphotericin B. *Mycoses*. 2014; 57(2):116–20.
28. Feng P, Najafzadeh MJ, Sun J, Ahmed S, Xi L, De Hoog GS, et al. In vitro activities of

nine antifungal drugs against 81 *Phialophora* and *Cyphellophora* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(11):6044–7.

29. Najafzadeh MJ, Badali H, Illnait-Zaragozi MT, De Hoog GS, Meis JF. In vitro activities of eight antifungal drugs against 55 clinical isolates of *Fonsecaea* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(4):1636–8.

30. Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol.* 2003; 38(2):143–58.

31. Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(11):3519–28.

32. Cunha MML, Franzen AJ, Alviano DS, Zanardi E, Alviano CS, De Souza W, et al. Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. *Microsc Res Tech.* 2005; 68(6):377–84.

33. Franzen AJ, Cunha MML, Batista EJO, Seabra SH, de Souza W, Rozental S. Effects of tricyclazole (5-methyl-1,2,4-triazol[3,4] benzothiazole), a specific DHN-melanin inhibitor, on the morphology of *Fonsecaea pedrosoi* conidia and sclerotic cells. *Microsc Res Tech.* 2006; 69(9):729–37.

34. Cunha MML, Franzen AJ, Seabra SH, Herbst MH, Vugman NV, Borba LP et al. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: A trap for oxidative radicals. *BMC Microbiol.* 2010; 10:80.

35. van de Sande WWJ, de Kat J, Coppens J, Ahmed AOA, Fahal A, Verbrugh H, et al. Melanin biosynthesis in *Madurella mycetomatis* and its effect on susceptibility to itraconazole and ketoconazole. *Microbes Infect.* 2007; 9(9):1114–23.

36. Castro RM, Castro LG. On the priority of description of chromomycosis. *Mykosen.* 1987; 30(9):397–403.

37. Lane C. A cutaneous disease caused by a new fungus *Phialophora verrucosa*. *J Cutan Dis.* 1915; 33:840–6.

38. Medlar E. A cutaneous infection caused by a new fungus *Phialophora verrucosa* with a study of the fungus. *J Med Res.* 1915; 32:507–22.

39. Pedroso A, Gomes J. Sobre quatro casos de dermatite verrucosa produzida pela *Phialophora verrucosa*. *An Paul Med Cir.* 1920; 11:53–61.

40. Rudolph M. Über die brasilianische “Figueira” (Vorläufige Mitteilung). *Arch Schiffs Trop Hyg.* 1914; 18:498–9.

41. Torres-Guerrero E, Isa-Isa R, Isa M, Arenas R. Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol.* 2012; 30(4):403–8.

42. Krzysciak PM, Pindycka-Piaszczynska M, Piaszczynski M. Chromoblastomycosis. *Postep*



Dermatologii i Alergol. 2014; 31(5):310–21.

43. Negroni P. Estudio del primer caso argentino de cromomicosis, *Fonsecaea* (Neg.) *pedrosoi* (Brump) 1921. Dept Nat Hig Rev Inst Bacteriol. 1936; 7:419–26.
44. Terra F, Torres M, Fonseca Filho O, Arêa Leão A. Novo tipo de dermatite verrucosa; micose por *Acrotheca* com associação de leishmaniose. Bras Med. 1922; 36:363–8.
45. Moore M, Almeida F. Etiologic agents of chromomycosis (chromoblastomycosis of Terra, Torres, Fonseca and Leão, 1922) of North and South America. Rev Biol Hyg. 1935; 6:94–7.
46. Ajello L, Georg L, Steilbige R, Wang K. A case of phaeohyphomycosis caused by a new species of *Phialophora*. Mycologia. 1974; 66:490–8.
47. Hernández-Hernández F, Vargas-Arzola J, Ríos-Cruz OP, Córdova-Martínez E, Manzano-Gayosso P, Segura-Salvador A. First case of chromoblastomycosis due to *Phoma insulana*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018; 36(2):95–9.
48. Liu Z-H, Xia X-J. Successful sequential treatment with itraconazole and ALA-PDT for chromoblastomycosis because of *Alternaria alternata*. Dermatol Ther. 2014; 27(6):357–60.
49. Torres-Guerrero E, Arenas R, Castro RH. Chromoblastomycosis due to *Cladosporium langeronii*. Molecular diagnosis of an agent previously diagnosed as *Fonsecaea pedrosoi*. An Bras Dermatol. 2018; 93(3):475–6.
50. Brischetto A, Kidd S, Baird R. First reported Australian case of *Cladophilophora arxii*: features consistent with possible primary pulmonary chromoblastomycosis. Am J Trop Med Hyg. 2015; 92(4):791–3.
51. Zhu C-Y, Yang Y-P, Sheng P, Li W, Huang W-M, Fan Y-M. Cutaneous chromoblastomycosis caused by *Veronaea botryosa* in a patient with pemphigus vulgaris and review of published reports. Mycopathologia. 2015; 180(1–2):123–9.
52. Kampirapap K, Reangchainam S, Ornpaew P, Tresukosol P. Chromoblastomycosis masquerading as dermatophytosis, with the description of a new opportunistic species. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2015; 46(1):105–9.
53. Garzon LM, Rueda LJ, Celis AM, Cardenas M, Guevara-Suarez M. *Exophiala psychrophila*: A new agent of chromoblastomycosis. Med Mycol Case Rep. 2019; 23:31–3.
54. Gomes RR, Vicente VA, Azevedo CMPS de, Salgado CG, da Silva MB, Queiroz-Telles F, et al. Molecular epidemiology of agents of human chromoblastomycosis in Brazil with the description of two novel species. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(11):e0005102.
55. Azevedo CMPS, Marques SG, Santos DWCL, Silva RR, Silva NF, Santos DA, et al. Squamous cell carcinoma derived from chronic chromoblastomycosis in Brazil. Clin Infect Dis. 2015; 60(10):1500–4.
56. 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; 54(5):e577–82.

57. Najafzadeh MJ, Ende G, Vicente VA, Dolatabadi S, Sun J, de Hoog GS. de H. Identification of chromoblastomycosis agents by PCR based reverse line blot (PCR-RLB) hybridization assay. *Microb Pathog.* 2018; 125:43–7.
58. Shi M, Li X, Feng J, Jia S, Xiao X, Chen C et al. High-resolution melting analysis assay for identification of *Fonsecaea* species. *J Clin Lab Anal.* 2018; 32(2):e22257.
59. Sun J, Najafzadeh MJ, van den Ende AHGG, Vicente VA, Feng P, Xi L et al. Molecular characterization of pathogenic members of the genus *Fonsecaea* using multilocus analysis. *PLoS One.* 2012; 7(8): e41512.
60. Lim S-W, Suh M-K, Kang G-S, Ha G-Y, Kim H, Choi J-S et al. Molecular phylogenetics of *Fonsecaea* strains isolated from chromoblastomycosis patients in South Korea. *Mycoses.* 2011; 54(5):e415–20.
61. Queiroz-Telles, F. Chromoblastomycosis: A neglected tropical disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015; 57:46–50.
62. Esterre P, Andriantsimahavandy A, Raharisolo C. Natural history of chromoblastomycosis in Madagascar and the Indian Ocean. *Bull Soc Pathol Exot.* 1997; 90(5):312–7.
63. Rasamoelina T, Raharolahy O, Rakotozandrindrainy N, Ranaivo I, Andrianarison M, Rakotonirina B et al. Chromoblastomycosis and sporotrichosis, two endemic but neglected fungal infections in Madagascar. *J Mycol Med.* 2017; 27(3):312–24.
64. Silva JP, de Souza W, Rozental S. Chromoblastomycosis: A retrospective study of 325 cases on Amazonic region (Brazil). *Mycopathologia.* 1998; 143(3):171–5.
65. Pires CAA, Xavier MB, Quaresma JAS, Macedo GMM de, Sousa BR de M, Brito AC de. Clinical, epidemiological and mycological report on 65 patients from the Eastern Amazon region with chromoblastomycosis. *An Bras Dermatol.* 2012; 87(4):555–60.
66. Minotto R, Bernardi CDV, Mallmann LF, Edelweiss MIA, Scroferneker ML. Chromoblastomycosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *J Am Acad Dermatol.* 2001; 44(4):585–92.
67. Pindycka-Piaszczyńska M, Krzyściak P, Piaszczyński M, Cieślik S, Januszewski K, Izdebska-Straszak G. Chromoblastomycosis as an endemic disease in temperate Europe: First confirmed case and review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33(3):391–8.
68. Cateau E, Cante V, Garcia Hermoso D, Rodier M-H. Case of *Fonsecaea nubica* chromoblastomycosis from the French territory of Mayotte. *JMM case reports.* 2014; 1(4):e004218.
69. Garcia-Navarro X, Díaz-Sarrió C, Viñas-Arenas M, Martín-Plata C. *Fonsecaea pedrosoi* cutaneous chromomycosis acquired in a Catalanian forest. *Piel.* 2017; 32(5):316–8.
70. Richarz NA, Jaka A, Fernández-Rivas G, Bassas J, Bielsa I, Ferrándiz C. First case of

chronic cutaneous chromoblastomycosis by *Rhinocladiella similis* acquired in Europe. Clin Exp Dermatol. 2018; 43(8):925–7.

71. Silva C de MP e, Rocha RM da, Moreno JS, Branco M dos RFC, Silva RR, Marques SG, et al. O babaçu (*Orbignya phalerata martins*) como provável fator de risco de infecção humana pelo agente da cromoblastomicose no Estado do Maranhão, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 1995; 28(1):49–52.

72. Salgado CG, da Silva JP, Diniz JAP, da Silva MB, da Costa PF, Teixeira C, et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004; 46(1):33–6.

73. Hernández-Hernández F, de Bievre C, Camacho-Arroyo I, Cerbon MA, Dupont B, Lopez-Martinez R. Sex hormone effects on *Phialophora verrucosa* in vitro and characterization of progesterone receptors. Med Mycol. 1995; 33(4):235–9.

74. Mouchalouat M de F, Galhardo MCG, Zancópe-Oliveira RM, Fialho PCM, Coelho JMC de O, Tavares PMS et al. Chromoblastomycosis: A clinical and molecular study of 18 cases in Rio de Janeiro, Brazil. Int J Dermatol. 2011; 50(8):981–6.

75. Pérez-Blanco M, Valles RH, García-Humbría L, Yegres F. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcón State, Venezuela. Med Mycol. 2006; 44(5):467–71.

76. Ogawa MM, Peternelli MP, Enokihara MMSS, Nishikaku AS, Gonçalves SS, Tomimori J. Spectral manifestation of melanized fungal infections in kidney transplant recipients: report of six cases. Mycopathologia. 2016; 181(5–6):379–85.

77. Sideris ER, Ge L. Chromoblastomycosis in immunosuppressed patients. Med J Aust. 2018 Sep; 209(7):295.

78. Ilyas M, Sharma A. Cutaneous fungal infections in solid organ transplant recipients. Transplant Rev. 2017; 31(3):158–65.

79. Zambelli AB, Griffiths CA. South African report of first case of chromoblastomycosis caused by *Cladosporium* (syn *Cladophialophora*) *carrionii* infection in a cat with feline immunodeficiency virus and lymphosarcoma. J Feline Med Surg. 2015; 17(4):375–80.

80. Hosoya T, Hanafusa Y, Kudo T, Tamukai K, Une Y. First report of *Veronaea botryosa* as a causal agent of chromomycosis in frogs. Med Mycol. 2015; 53(4):369–77.

81. Riddel CE, Surovik JG, Chon SY, Wang W-L, Cho-Vega JH, Cutlan JE et al. Fungal foes: Presentations of chromoblastomycosis post-hurricane Ike. Cutis. 2011; 87(6):269–72.

82. Carrión AL. Chromoblastomycosis. 1950; 50:1255–82.

83. Gaviria-Giraldo CM, Cardona-Castro N. Esporotricosis y cromoblastomicosis: revisión de la literatura. CES Med. 2017; 31(1):79–91.

84. Li C. Chromoblastomycosis in China. Korean J Med Mycol. 2011; 16(4):169–71. 2

85. Tawade Y, Gaikwad A, Deodhar A, Bhide D, Romi E, Pradhan A et al. Uncommon presentation of chromoblastomycosis. *Cutis*. 2018; 101(6):442-48.
86. Panicker NK, Chandanwale SS, Sharma YK, Chaudhari US, Mehta G V. Chromoblastomycosis: Report of two cases on face from urban industrial area. *Indian Dermatol Online J*. 2013; 4(4):371-3.
87. Estrada VFM, Paz GAV, Tolosa MR. Chromomycosis: Report of a case with unusual topography. *Rev Iberoam Micol*. 2011; 28(1):50-2.
88. França K, Villa RT, Bastos VR de A, Almeida ACC, Massucatti K, Fukumaru D et al. Auricular chromoblastomycosis: a case report and review of published literature. *Mycopathologia*. 2011; 172(1):69-72.
89. Lari HB, Mirani N, Chu DS. Corneal chromoblastomycosis caused by *Cladophialophora carrionii* after cataract surgery. *J Cataract Refract Surg*. 2011; 37(5):963-6.
90. Bui AQ, Espana EM, Margo CE. Chromoblastomycosis of the conjunctiva mimicking melanoma of the ciliary body. *Arch Ophthalmol*. 2012; 130(12):1615-7.
91. Fatemi MJ, Bateni H. Oral chromoblastomycosis: A case report. *Iran J Microbiol*. 2012; 4(1):39-42.
92. Agarwal R, Singh G, Ghosh A, Verma KK, Pandey M, Xess I. Chromoblastomycosis in India: Review of 169 cases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(8): e0005534.
93. 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(1):3-15.
94. de Azevedo CMPS, Gomes RR, Vicente VA, Santos DWCL, Marques SG, do Nascimento MMF et al. *Fonsecaea pugnacius*, a novel agent of disseminated chromoblastomycosis. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(8):2674-85.
95. Tourret J, Benabdellah N, Drouin S, Charlotte F, Rottembourg J, Arzouk N, et al. Unique case report of a chromomycosis and *Listeria* in soft tissue and cerebellar abscesses after kidney transplantation. *BMC Infect Dis*. 2017; 17(1):288.
96. Camara-Lemarroy CR, Soto-Garcia AJ, Preciado-Yopez CI, Moreno-Hoyos F, Hernandez-Rodriguez PA, Galarza-Delgado DA. Case of chromoblastomycosis with pulmonary involvement. *J Dermatol*. 2013; 40(9):746-8.
97. Thomas E, Bertolotti A, Barreau A, Klisnick J, Tournebize P, Borgherini G et al. From phaeohyphomycosis to disseminated chromoblastomycosis: A retrospective study of infections caused by dematiaceous fungi. *Med Mal Infect*. 2018; 48(4):278-85.
98. Solórzano S, García R, Hernández-Córdova G. Chromomycosis: Report of a disabling case. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011; 28(3):552-5.

99. Najafzadeh MJ, Sun J, Vicente VA, Klaassen CHW, Bonifaz A, van den Ende AHGG et al. Molecular epidemiology of *Fonsecaea* species. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17(3):464–9.
100. Fransisca C, He Y, Chen Z, Liu H, Xi L. Molecular identification of chromoblastomycosis clinical isolates in Guangdong. *Med Mycol*. 2017; 55(8):851–8.
101. Coelho RA, Brito-Santos F, Figueiredo-Carvalho MHG, Silva JVDS, Gutierrez-Galhardo MC, do Valle ACF, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of clinical strains of *Fonsecaea* spp. isolated from patients with chromoblastomycosis in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(7):e0006675.
102. Arnold TM, Dotson E, Sarosi GA, Hage CA. Traditional and emerging antifungal therapies. *Proc Am Thorac Soc*. 2010; 7(3):222–8.
103. Clissold SM, Grant SP. Itraconazole: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in superficial and systemic mycoses. *Drugs*. 1989; 37:310–344.
104. Silva-Rocha WP, Cardoso FJR, Colalto W, Melo ASA, Chaves GM. Clinical improvement of chromoblastomycosis refractory to itraconazole successfully treated with high dose of terbinafine. *J Dermatol*. 2013; 40(9):775–6.
105. Queiroz-Telles F, Santos DW de CL. Challenges in the therapy of chromoblastomycosis. *Mycopathologia*. 2013; 175(5–6):477–88.
106. de Lima AM, de Paula LZP, Goetz HS, Torraca P de FS, Sacht GL, Aseka GK et al. Response of chromoblastomycosis to voriconazole. *An Bras Dermatol*. 2016; 91(5):679–81.
107. Criado PR, Careta MF, Valente NYS, Martins JEC, Rivitti EA, Spina R et al. Extensive long-standing chromomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*: Three cases with relevant improvement under voriconazole therapy. *J Dermatolog Treat*. 2011; 22(3):167–74.
108. Hellwig AH da S, Heidrich D, Zanette RA, Scroferneker ML. In vitro susceptibility of chromoblastomycosis agents to antifungal drugs: A systematic review. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019; 16:108–14.
109. Tamura K, Matsuyama T, Yahagi E, Kojima T, Akasaka E, Kondo A et al. A case of chromomycosis treated by surgical therapy combined with preceded oral administration of terbinafine to reduce the size of the lesion. *Tokai J Exp Clin Med*. 2012; 37(1):6–10.
110. Bassas-Vila J, Fuente MJ, Guinovart R, Ferrándiz C. Chromoblastomycosis: Response to combination therapy with cryotherapy and terbinafine. *Actas Dermosifiliogr*. 2014; 105(2):196–8.
111. Huang T-H, Lan C-CE. Cutaneous chromoblastomycosis effectively treated with local heat monotherapy. *Clin Experim Dermat*. 2018; 44(4):461-462.
112. Yang Y, Hu Y, Zhang J, Li X, Lu C, Liang Y et al. A refractory case of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora* with improvement by photodynamic therapy. *Med Mycol*. 2012; 50(6):649–53.

113. Huang X, Han K, Wang L, Peng X, Zeng K, Li L. Successful treatment of chromoblastomycosis using ALA-PDT in a patient with leukopenia. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 26:13–4.
114. Lyon JP, Azevedo C de MP e S, Moreira LM, de Lima CJ, de Resende MA. Photodynamic antifungal therapy against chromoblastomycosis. *Mycopathologia.* 2011; 172(4):293–7.
115. Revankar SG, Sutton DA. Melanized fungi in human disease. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23(4):884–928.
116. Espinel-ingroff A, Turnidge J. The role of epidemiological cutoff values (ECVs / ECOFFs) in antifungal susceptibility testing and interpretation for uncommon yeasts and moulds. *Rev Iberoam Micol.* 2016; 33(2):63–75.
117. Wootton M, MacGowan AP, Howe RA. Towards better antimicrobial susceptibility testing: Impact of the journal of antimicrobial chemotherapy. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72(2):323–9.
118. Idelevich EA, Sparbier K, Kostrzewa M, Becker K. Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay. *Clin Microbiol Infect.* 2018; 24(7):738–43.
119. Mello E, Posteraro B, Vella A, de Carolis E, Torelli R, D'Inzeo T et al. Susceptibility testing of common and uncommon *Aspergillus* species against posaconazole and other mold-active antifungal azoles using the Sensititre method. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(6):1–7.
120. Siopi M, Pournaras S, Meletiadis J. crossm Comparative evaluation of Sensititre YeastOne and CLSI M38-A2 Reference. 2017; 55(6):1714–9.
121. Bougnoux ME, Dannaoui E, Accoceberry I, Angoulvant A, Bailly E, Botterel F, et al. Multicenter comparison of the etest and EUCAST methods for antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates to micafungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(8):5088–91.
122. Gupta P, Khare V, Kumar D, Ahmad A, Banerjee G, Singh M. Comparative evaluation of disc diffusion and E-test with broth micro-dilution in susceptibility testing of amphotericin B, voriconazole and caspofungin against clinical *Aspergillus* isolates. *J Clin Diagnostic Res.* 2015; 9(1):DC04–7.
123. Koehling HL, Willinger B, Buer J, Rath PM, Steinmann J. Comparative evaluation of a new commercial colorimetric microdilution assay (SensiQuattro *Candida* EU) with MIC test strip and EUCAST broth microdilution methods for susceptibility testing of invasive *Candida* isolates. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(1):255–61.
124. Lamoth F, Alexander BD. Comparing Etest and broth microdilution for antifungal susceptibility testing of the most-relevant pathogenic molds. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(10):3176–81.

125. Posteraro B, De Carolis E, Vella A, Sanguinetti M. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: Identification of fungi and beyond. *Expert Rev Proteomics*. 2013; 10(2):151–64.
126. Vella A, De Carolis E, Mello E, Perlin DS, Sanglard D, Sanguinetti M et al. Potential use of MALDI-ToF mass spectrometry for rapid detection of antifungal resistance in the human pathogen *Candida glabrata*. *Sci Rep*. 2017; 7(1):1–9.
127. Saracli MA, Fothergill AW, Sutton DA, Wiederhold NP. Detection of triazole resistance among *Candida* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Med Mycol*. 2015; 53(7):736–42.
128. Bailey D, Diamandis EP, Greub G, Poutanen SM, Christensen JJ, Kostrzew M. Use of MALDI-TOF for diagnosis of microbial infections. *Clin Chem*. 2013; 59(10):1435–41.
129. Ostrosky-Zeichner L, Andes D. The role of in vitro susceptibility testing in the management of *Candida* and *Aspergillus*. *J Infect Dis*. 2017; 216(Suppl 3):S452–7.
130. Wenning M, Scherer S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: Perspectives and limitations of the method. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013; 97(16):7111–20.
131. Sockalingum GD, Bouhedja W, Pina P, Allouch P, Mandray C, Labia R, et al. ATR-FTIR spectroscopic investigation of imipenem-susceptible and -resistant *Pseudomonas aeruginosa* isogenic strains. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 232(1):240–6.
132. Pomerantz A, Cohen Y, Shufan E, Ben-Naim Y, Mordechai S, Salman A et al. Characterization of *Phytophthora infestans* resistance to mefenoxam using FTIR spectroscopy. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2014; 141:308–14.
133. Deng S, Lei W, de Hoog GS, Yang L, Vitale RG, Rafati H, et al. Combination of amphotericin B and terbinafine against melanized fungi associated with chromoblastomycosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(6): e00270-18.
134. Santos ALS, Palmeira VF, Rozental S, Kneipp LF, Nimrichter L, Alviano DS et al. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiol Rev*. 2007; 31(5):570–91.
135. Palmeira VF, Goulart FRV, Granato MQ, Alviano DS, Alviano CS, Kneipp LF et al. *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells: Secretion of aspartic-type peptidase and susceptibility to peptidase inhibitors. *Front Microbiol*. 2018; 9:1383.
136. Bell AA, Wheeler MH. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu Rev Phytopathol*. 1986; 24:411–51.
137. Urán ME, Cano LE. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. 2008; 12(2):128–48.
138. Enochs WS, Nilges MJ, Swartz HM. Purified human neuromelanin, synthetic dopamine melanin as a potential model pigment, and the normal human substantia nigra:

- characterization by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Neurochem.* 1993; 61(1):68–79.
139. Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(4):708–17.
140. Eisenman HC, Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 93(3):931–40.
141. Butler MJ, Day AW. Fungal melanins: a review. *Can J Microbiol.* 1998; 44:1115–36.
142. Kogej T, Wheeler MH, Lanisnik Rizner T, Gunde-Cimerman N. Evidence for 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 232(2):203–9.
143. Henson JM, Butler MJ, Day AW. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol.* 1999; 37:447–71.
144. Alviano CS, Farbiarz SR, De Souza W, Angluster J, Travassos LR. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *J Gen Microbiol.* 1991; 137(4):837–44.
145. Franzen AJ, de Souza W, Farina M, Alviano CS, Rozental S. Morphometric and densitometric study of the biogenesis of electron-dense granules in *Fonsecaea pedrosoi*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999; 173(2):395–402.
146. Franzen AJ, Cunha MML, Miranda K, Hentschel J, Plattner H, da Silva MB et al. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *J Struct Biol.* 2008; 162(1):75–84.
147. Mendoza L, Karuppayil SM, Szaniszlo PJ. Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi. *Mycoses.* 1993; 36(5–6):157–64.
148. da Silva JP, Alviano DS, Alviano CS, de Souza W, Travassos LR, Diniz JAP et al. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: Ultrastructure and antigenicity. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002; 33(1):63–9.
149. Tokousbalides MC, Sisler HD. Effect of tricyclazole on growth and secondary metabolism in *Pyricularia oryzae*. *Pestic Biochem Physiol.* 1978; 8(1):26–32.
145. Kunova A, Pizzatti C, Cortesi P. Impact of tricyclazole and azoxystrobin on growth, sporulation and secondary infection of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Pest Manag Sci.* 2013; 69(2):278–84.
151. Tokousbalides MC, Sisler HD. Site of inhibition by tricyclazole in the melanin biosynthetic pathway of *Verticillium dahliae*. *Pestic Biochem Physiol.* 1979; 11(1–3):64–73.
152. Stipanovic RD, Wheeler MH. Accumulation of 3,3'-biflavinol, a melanin shunt product, by tricyclazole-treated *Thielaviopsis basicola*. *Pestic Biochem Physiol.* 1980; 13(2):198–201.
153. Peterson LG. Tricyclazole for control of *Pyricularia oryzae* on rice: The relationship of



- the mode of action and disease occurrence and development. *Pest Manag Rice*. 1990; 122–30.
154. Kumar M, Chand R, Dubey RS, Shah K. Effect of tricyclazole on morphology, virulence and enzymatic alterations in pathogenic fungi *Bipolaris sorokiniana* for management of spot blotch disease in barley. *World J Microbiol Biotechnol*. 2015; 31(1):23–35.
155. Kong Q, Yu X, Song D, Ren X. Effect of tricyclazole on morphology, virulence and gene expression of *Aspergillus aculeatus* for management of soft rot disease in peach. *J appl microbiol*. 2018; 125:1827-35.
156. Wheeler MH, Bhatnagar D, Rojas MG. Chlobenthiazone and tricyclazole inhibition of aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus flavus*. *Pestic Biochem Physiol*. 1989; 35:315–23.
157. Lazarovits G, Stoessl A. Tricyclazole induces melanin shunt products and inhibits altersolanol A accumulation by *Alternaria solani*. *Pestic Biochem Physiol*. 1988; 31:36–45.
158. Woloshuk CP, Sisler HD, Tokousbalides MC, Dutky SR. Melanin biosynthesis in *Pyricularia oryzae*: Site of tricyclazole inhibition and pathogenicity of melanin-deficient mutants. *Pestic Biochem Physiol*. 1980; 14(3):256–64.
159. Li XQ, Guo BL, Cai WY, Zhang JM, Huang HQ, Zhan P, et al. The role of melanin pathways in extremotolerance and virulence of *Fonsecaea* revealed by de novo assembly transcriptomics using illumina paired-end sequencing. *Stud Mycol*. 2016; 83:1–18.
160. Pacelli C, Bryan RA, Onofri S, Selbmann L, Shuryak I, Dadachova E. Melanin is effective in protecting fast and slow growing fungi from various types of ionizing radiation. *Environ Microbiol*. 2017; 19(4):1612–24.
161. Rangel DEN, Butler MJ, Torabinejad J, Anderson AJ, Braga GUL, Day AW et al. Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. *J Invertebr Pathol*. 2006; 93(3):170–82.
162. Kejzar A, Gobec S, Plemenitas A, Lenassi M. Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. *Fungal Biol*. 2013; 117(5):368–79.
163. Hillmann F, Novohradská S, Mattern DJ, Forberger T, Heinekamp T, Westermann M. Virulence determinants of environmentally acquired pathogenic fungi help to escape from soil amoeba predation. *Int J Med Microbiol*. 2015; 17(8):2858-69.
164. Sun J, Zhang J, Najafzadeh MJ, Badali H, Li X, Xi L, et al. Melanization of a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora* increases tolerance to stress factors while no effects on antifungal susceptibility. *Mycopathologia*. 2011; 172(5):373–80.
165. Zhdanova NN, Zakharchenko VA, Vember VV, Nakonechnaya LT. Fungi from Chernobyl: Mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. *Mycol Res*. 2000; 104(12):1421–6.
166. Heidrich D, Corbellini VA, Mendes SDC, Fernandes EK, Lazzarotto L, Ribeiro AC et al. Melanin: Quantification and protection against oxidative stress in chromoblastomycosis agents. *Med Mycol*. 2019; 57(2):260–3.

167. Zhang J, Wang L, Xi L, Huang H, Hu Y, Li X et al. Melanin in a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora* inhibits the production of nitric oxide and Th1 cytokines of murine macrophages. *Mycopathologia*. 2013; 175(5–6):515–22.
168. Bocca AL, Brito PPMS, Figueiredo F, Tosta CE. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: A role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia*. 2006; 161(4):195–203.
169. Heinekamp T, Thywissen A, Macheleidt J, Keller S, Valiante V, Brakhage AA. *Aspergillus fumigatus* melanins: interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence. *Front Microbiol*. 2012; 3:440.
170. da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Taborda CP. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: Effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect*. 2006; 8(1):197–205.
171. Baltazar LM, Werneck SMC, Soares BM, Ferreira MVL, Souza DG, Pinotti M et al. Melanin protects *Paracoccidioides brasiliensis* from the effects of antimicrobial photodynamic inhibition and antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(7):4003–11.
172. Larsson BS. Interaction between chemicals and melanin. *Pigment Cell Res*. 1993; 6(3):127–33.
173. van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(11):3394–400.
174. Wang Y, Casadevall A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-Dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38(11):2648–50.
175. Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiol Immunol*. 2003; 47(4):271–7.
176. Kaewmalakul J, Nosanchuk JD, Vanittanakom N, Youngchim S. Melanization and morphological effects on antifungal susceptibility of *Penicillium marneffeii*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2014; 106(5):1011–20.
177. Mario DAN, Santos RCV, Denardi LB, Vaucher R de A, Santurio JM, Alves SH. Interference of melanin in the susceptibility profile of *Sporothrix* species to amphotericin B. *Rev Iberoam Micol*. 2016; 33(1):21–5.
178. Almeida-Paes R, Figueiredo-Carvalho MHG, Brito-Santos F, Almeida-Silva F, Oliveira MME, Zancopé-Oliveira RM. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. *PLoS One*. 2016; 11(3):e0152796.
179. Polak A, Dixon DM. Loss of melanin in *Wangiella dermatitidis* does not result in greater

susceptibility to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33(9):1639–40.

180. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Agenda de Prioridades de Pesquisa do Ministério da Saúde – APPMS. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tecnologia. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

## 7 ARTIGO

Artigo formatado para submissão na revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

**Article title: PREDICTION OF ITRACONAZOLE MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION OF *FONSECAEA PEDROSOI* USING FTIR AND CHEMOMETRICS**

**Running title: DETERMINATION OF ANTIFUNGAL SUCEPTIBILITY USING FTIR**

Alessandra Koehler 1; Valeriano Antonio Corbellini 2; Daiane Heidrich 3\*; Maria Lúcia Scroferneker 1,4

1 Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400 – CEP: 90035-003, Porto Alegre – RS, Brazil.

2 Department of Chemistry and Physics, Postgraduate Program in Health Promotion, Postgraduate Program in Environmental Technology, Universidade de Santa Cruz do Sul. Avenida Independência, 2293 – CEP 96815-900, Santa Cruz do Sul - RS, Brazil.  
valer@unisc.br

3 Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400 – CEP: 90035-003, Porto Alegre – RS, Brazil. \*Present address: Postgraduate Program in Biotechnology, Universidade do Vale do Taquari. Avenida Avelino Tallini, 171 – CEP 95914-014, Lajeado – RS, Brazil.

4 Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500 – CEP 90050-170, Porto Alegre – RS, Brazil.  
scrofern@ufrgs.br

## SYNOPSIS

**Objectives:** Predict the itraconazole (ITC) MIC and respective metabolic adaptations of *Fonsecaea pedrosoi* using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and chemometrics.

**Methods:** Thirty-six genotyped isolates of *F. pedrosoi* were studied. Susceptibility to ITC was performed according to CLSI and with addition of tricyclazole (TCZ). Isolates were grown in Sabouraud agar alone and with ITC and TCZ and prepared for Attenuated Total Reflection (ATR)/FTIR analysis where five spectra were recorded from 4000 to 650  $\text{cm}^{-1}$ . Data set was sample pre-processed by amplitude normalization and 1<sup>st</sup> derivative. Partial least squares regression (PLS) was performed with quintuplicates using one component of orthogonal signal correction (OSC) and leave-one-out step-validation. Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) were carried out with the normalized mean-centered average spectra of the difference between the tests and the control of each isolate.

**Results:** the average spectra of *F. pedrosoi* isolates presented little variability. Resistant isolates were differentiated ( $p < 0.05$ ) of the non-resistant by the region 1038  $\text{cm}^{-1}$  (structures of the cell wall). A coefficient of determination ( $R^2$ ) greater than 0.99 was obtained for both MIC ITC (root mean square error of prediction - RMSEP = 0.0645 mg/L) and MIC ITC+TCZ (RMSEP = 0.0063 mg/L) ATR/PLS models. PCA and HCA showed clusters of resistant isolates and until three spectral morphotypes patterns of *F. pedrosoi* second the treatment with ITC/TCZ.

**Conclusions:** this was the first study to propose the use of FTIR and chemometric analyses supervised by M38-A2 protocol for predicting itraconazole MICs of *F. pedrosoi* and its correlating metabolic adaptations. The novel method has high predictive quality to wide range of MICs. Further studies are needed to interpret the clinical repercussions of *F. pedrosoi* metabolic adaptations using ITC and TCZ.

## INTRODUCTION

*Fonsecaea pedrosoi* is a dematiaceous filamentous fungus found in soil, plants and decomposing wood,<sup>1</sup> that produces dihydroxynaphthalene (DNH)-melanin which acts as a protective and virulence factor.<sup>2</sup> *F. pedrosoi* is the main agent of chromoblastomycosis (CBM) in tropical regions,<sup>3</sup> a chronic subcutaneous, disabling and recalcitrant mycosis.<sup>4</sup> CBM is classified by World Health Organization (WHO) in the group of "neglected tropical diseases", which are endemic in tropical and subtropical regions of the planet, affecting the poorest population in Latin America, Africa and Asia.<sup>5,6</sup>

Treatment is based on antifungal therapy, which can also be combined with physical and surgical methods. Severe cases are extremely difficult to treat by the recalcitrant nature of CBM.<sup>7</sup> Lesions caused by *F. pedrosoi* generally have a greater resistance to treatment.<sup>8</sup> The most commonly used antifungal is itraconazole (ITC), with long treatment of 8 to 10 months.<sup>9</sup> Yet, there are no randomized clinical trials for the choice of the best therapy.<sup>4</sup> So, *in vitro* antifungal susceptibility testing may assist in that choice.

For filamentous fungi, the standard protocol for these trials is the M38 of the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).<sup>10,11</sup> However, reference methods are not focused on clinical application, have high complexity, high cost and require a long working time.<sup>12</sup> Besides this, they are not yet standardized for CBM agents. Thus, there are commercial tests adapted from the standard protocols, which are applicable in the routines of laboratories.<sup>1</sup> However, they are mainly focused on yeasts and are not standardized for filamentous fungi, so their use for these microorganisms is not yet indicated.<sup>14</sup>

Considering some of the limitations of conventional methods, new methodologies for *in vitro* susceptibility testing have been developed. One that has great potential is Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). This technique generates spectra that contain the fingerprint of the sample and has extensive applications in the biomedical area.<sup>15</sup> Its main

advantages are: use of a very small amount of sample, its preservation during analysis and minimal need for preparation; little or no generation of residues; speed of analysis; accuracy and reproducibility; and storage and manipulation of data directly in a computer software.<sup>16</sup>

Few studies in the literature use FTIR for susceptibility analyses; however, those who used this methodology presented promising results.<sup>17-20</sup> Yet, there are no such works with filamentous fungi. In the case of CBM agents, whose susceptibility tests are carried out following the M38 reference method,<sup>21,22,23,24</sup> the use of FTIR may have numerous advantages, especially regarding costs, labor and waste generation. Considering what was exposed above, the objective of this work was to develop a prediction model of itraconazole MICs and respective metabolic adaptations of *F. pedrosoi* using FTIR and chemometric analyses.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Microorganisms**

Thirty-six clinical isolates of the species *F. pedrosoi* from the collection of fungi of Laboratory of Pathogenic Fungi, Department of Microbiology, ICBS, UFRGS were studied. All isolates were previously identified by sequencing ITS1-5,8S-ITS2 DNA region and deposited in GenBank® database (Table 1).

Itraconazole MICs for the isolates of *F. pedrosoi* were determined previously (unpublished results),<sup>25</sup> using the microdilution technique according to M38-A2 protocol of CLSI, with a final antifungal concentration varying between 0.0625 – 32 mg/L. For each isolate, ITC MICs were also determined with the addition of tricyclazole (Table 1).

**Table 1.** Isolates used in the study, their GenBank® accession numbers and MIC values.<sup>25</sup>

Isolate number	GenBank® accession number	MIC ITC (mg/L)	MIC ITC+TCZ (mg/L)
1	MH382049	2	0.5
2	MH382054	0.5	0.5
3	MH382034	0.125	0.5
4	MH382053	1	0.5
5	MH444810	0.25	0.5
6	MH382089	0.5	0.25
7	MH382042	0.5	0.25
8	MH382043	32	1
9	MH382046	32	1
10	MH382052	0.5	0.25
12	MH382083	0.5	0.125
13	MH382029	0.5	0.5
14	MH382030	0.5	0.5
16	MH382081	2	0.5
17	MH382032	0.5	0.25
18	MH382033	32	1
19	MH382035	1	0.5
20	MH382036	1	0.06
21	MH382028	2	1
22	MH382047	0.5	0.5
23	MH382080	1	0.5
24	MH382045	0.5	1
25	MH382051	2	1
26	MH368488	0.5	0.5
27	MH382037	1	0.5
28	MH382038	1	0.5
29	MH382039	2	0.5
30	MH382040	0.5	0.5
31	MH382086	0.5	0.5
33	MH382041	0.5	0.5
34	MH382085	1	0.5
35	MH382050	1	0.5
36	MH382044	32	0.5
37	MH444807	1	1
38	MH382048	1	2
39	MH382087	0.25	0.25

MIC = minimum inhibitory concentration; ITC = itraconazole; TCZ = tricyclazole.



### **Isolates preparation for FTIR analysis**

Isolates were grown in potato agar dextrose (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at 30°C for 14 days. After this period, conidial suspensions were prepared scraping the surface of the colonies with sterile plastic loops and sterile saline solution (0.85%), with subsequent filtration using filter paper Whatman No. 1 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) to separate hyphae and conidia. Suspensions were standardized with Neubauer chamber between  $10^5$  and  $10^6$  conidia per mL. Of these filtrates, 850  $\mu$ L were spread on the total surface of Petri dishes of 7 cm in diameter containing 8 mL of Sabouraud dextrose agar (Acumedia, São Paulo, Brazil). Six plates were prepared for each isolate: one as control, containing only agar; two with addition of itraconazole (at final concentration of 0.14 mg/L and 0.56 mg/L;  $2 \times 10^{-5}$  and  $8 \times 10^{-5}$  mol/L, respectively); two with addition of tricyclazole (at final concentration of 4 mg/L and 16 mg/L); and one with addition of itraconazole combined with tricyclazole (at final concentration of 0.56 mg/L and 16 mg/L, respectively). The plates were cultivated at 30°C for 14 days.

Replicates (n=5) of fragments (approximately 1 cm x 1 cm) of the cultures on these plates were cut with scalpel, deposited on fragments (approximately 0.8 cm x 0.8 cm) of filter paper Whatman No. 1 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) in Petri dishes and dehydrated in a drying oven at 50°C for 1 hour. Subsequently, dry agar portions were removed from the plates and submitted to FTIR-ATR analysis.

### **FTIR-ATR analysis**

Spectra of the five fragments of each fungal sample were acquired by attenuated total reflectance (ATR) in a Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR (Perkin Elmer) spectrometer in the range of 4000 to 650  $\text{cm}^{-1}$  using a spectral resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ , pressure gauge 70 and 4 scans. Background was done reading the clean surface of the equipment without any sample.

## Chemometrics

The average spectra of each *F. pedrosoi* isolate were obtained after correction and normalization of each replicate by amplitude (0-1). In total, there were five average spectra for each isolate, including the control and the treatments. All chemometrics analysis were made in the software Pirouette 4.0 (Infometrix). Figures were made in the software OriginPro70.

PLS was used to make a calibration model for MIC ITC and MIC ITC+TCZ determination. For this analysis it was used the five replicates of each isolate instead of the average spectra, to increase the prediction power of the model. Spectral variables (wavenumbers) of each sample were pre-processed by Savitzky-Goulay 1<sup>st</sup> derivative (5 points) and the use of one orthogonal signal correction (OSC). The dataset was divided into a calibration set (CS) and external validation or prediction set (PS) using the systematic 1:1 alternating division, ordered from the lowest to the highest value of MIC ITC and MIC ITC+TCZ. The minimum and maximum values were purposely included in CS. Thus, CS and PS were prepared with 18 isolates each (total number of isolates = 36). The maximum number of latent variables allowed in the PLS model was defined according to the recommendation of ASTM E1655-05,<sup>26</sup> using the following equation:  $N = 6(A + 1)$ , where N is the number of CS elements ( $N = 18$ ) and A is the maximum number of latent variables allowed in the model, in order to avoid the occurrence of overfitting. The figures of merit used to evaluate the CS were the coefficient of determination ( $R^2$ ) and the root mean square error of cross-validation (RMSECV) using leave-one out step-validation for quintuplicates as software guidelines. The PS values were determined by adding one isolate (five replicates simultaneously) of *F. pedrosoi* at a time to the CS, identifying the predicted MIC values for each quintuplicate. PS performance was evaluated by  $R^2$  and root mean square error of prediction (RMSEP).

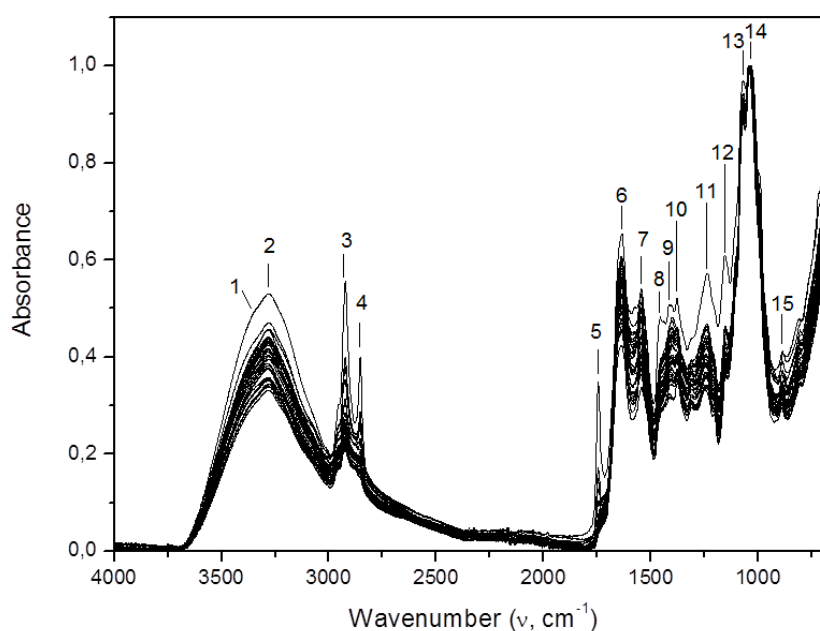
PCA was carried out with difference-normalized average spectra between tests and controls for each isolate of *F. pedrosoi*. Results were expressed as biplot PC1xPC2 after mean centering. Clusters were defined based on HCA (Euclidian distance, incremental clustering) at same preprocessing as PCA.

## RESULTS AND DISCUSSION

### FTIR spectra of *Fonsecaea pedrosoi*

The average spectra of the 36 isolates of *F. pedrosoi* presented little variability and showed the typical pattern of filamentous fungi (Figure 1).

The most prevalent bands ( $\sim 1150$ ,  $\sim 1070$  and  $\sim 1030$   $\text{cm}^{-1}$ ) are marked with the numbers **12**, **13** and **14** in Figure 1 and correspond to C-O-C and C-O dominated by ring vibrations of carbohydrates; represent the glucans that are present in the fungi cell wall.<sup>27,28</sup> This region ( $1038$   $\text{cm}^{-1}$ ) was the one that differentiated ( $p < 0.05$ ) the four resistant isolates from the non-resistant. Table 2 summarizes the characteristics and the biomolecular attributions of the bands marked on Figure 1.<sup>27,29-31</sup>



**Figure 1.** Total set of averaged FTIR-ATR spectra of *Fonsecaea pedrosoi* strains grown on Sabouraud medium. The numbers indicate the main bands found.

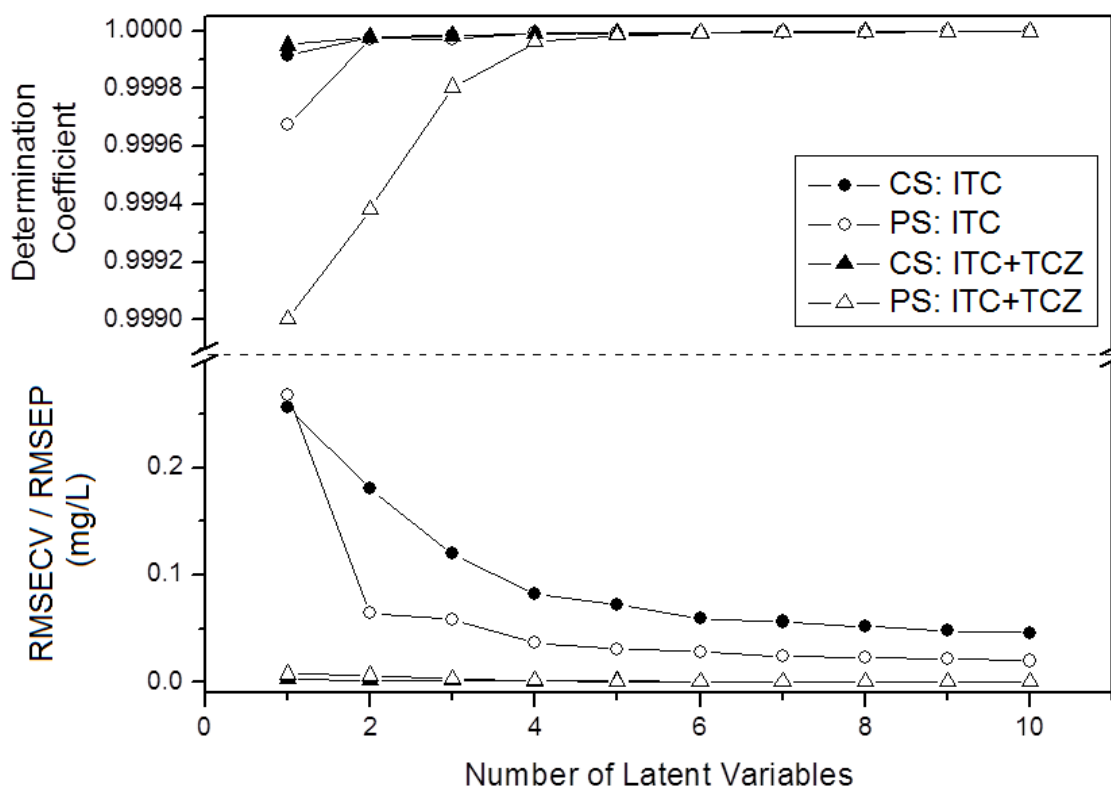
**Table 2.** Characteristics of the bands found in *F. pedrosoi* spectra.

Band number	Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Vibrational mode/molecular bond	Biomolecular attribution
1	~3335	O-H and N-H stretching modes of amide A and amide B	<b>Proteins</b>
2	~3280		
3	~2920	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> asymmetric stretching	<b>Lipids</b>
4	~2850	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> symmetric stretching	
5	~1745	C=O stretching	
6	~1640	C=O of amide I (β-pleated sheet structures)	<b>Proteins</b>
7	~1550	N-H, C-N of amide II	
8	~1450	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> asymmetric and symmetric bending	<b>Lipids, proteins</b>
9	~1400	C=O symmetric stretching of COO <sup>-</sup>	<b>Lipids, amino acids</b>
10	~1380	Amide III	<b>Proteins</b>
11	~1240	P=O asymmetric stretching of phosphodiester	<b>Nucleic acids, phospholipids</b>
12	~1150		
13	~1070	C-O-C, C-O stretching vibrations	<b>Carbohydrates</b>
14	~1030		
15	~890	Aromatic ring vibrations – “Fingerprint region”	<b>Amino acids, nucleotides</b>

References: Naumann<sup>27</sup>, Salman *et al.*<sup>29</sup>, Lecellier *et al.*<sup>30</sup>, Salman *et al.*<sup>31</sup>

## PLS prediction model of MICs

Different preprocessing associated with PLS regression were evaluated and the best performance for predicting MICs with ITC and ITC+TCZ was obtained with application of normalization by amplitude combined with 1st derivative and with 1 OSC component. The models obtained presented figures of merit (RMSECV/RMSEP and  $R^2$ ) compatible with high performance already with one latent variable (Figure 2). However, the relative error for ITC modeling was below the minimum MIC value quantified only with models with 2 VLs and this was the condition defined for the building and validation of PLS models (Table 3).



**Figure 2.** Figures of merit (RMSECV/RMSEP and respective coefficient of determination) profile of calibration and validation set of FTIR-ATR/PLS models of MIC ITC and MIC ITC+TCZ for *F. pedrosoi* samples investigated.

**Table 3.** Figures of merit of *F. pedrosoi* FTIR-ATR/PLS models of MIC ITC and MIC ITC+TCZ

Parameter Set	LV	Range (mg/L)	$\bar{y} \pm SD$ (mg/L)	R <sup>2</sup>	RMSECV RMSEP
MIC ITC					
CS	2	0.125 – 32	4.323 ± 9.938	0.999977	0.1803
PS	2			0.999973	0.0645
MIC ITC+TCZ					
CS	2	0.06 - 2	0.581 ± 0.354	0.999978	0.0022
PS	2			0.999382	0.0063

MIC = minimum inhibitory concentration; ITC = itraconazole; TCZ = tricyclazole; CS = calibration set. PS = prediction set; LV = number of latent variable;  $\bar{y}$  = mean; SD = standard deviation; R<sup>2</sup> = determination coefficient; RMSECV = root mean square error of cross validation; RMSEP = root mean square error of prediction.

A high correlation was obtained between the reference values of MIC ITC and MIC ITC+TCZ with the values predicted by FTIR, with R<sup>2</sup> greater than 0.99 for both parameters. In MIC ITC model RMSEP was equal to 0.0645 mg/L with relative error of 51.6%, and in MIC ITC+TCZ model RMSEP was equal to 0.0063 mg/L with relative error of 10.5%. These values were lower than the lower MIC measured in each category, which proves the optimal performance of the chosen model.

FTIR-ATR spectroscopy is already used efficiently in identification of microorganisms, as it provides highly specific fingerprints of the sample.<sup>32</sup> The susceptibility or resistance of a microorganism to a given drug is defined by very subtle changes in cells and this technique combined with multivariate statistical analyses is able to detect these characteristics.<sup>18</sup> This is the first work to propose the use of FTIR-ATR associated with chemometrics for prediction of MICs of a filamentous fungus species. Prediction occurred directly from the cultivation of the fungus in Sabouraud agar and it was not necessary its exposure to the antifungal tested. This indicates that the characteristics that determine susceptibility or resistance are intrinsic and are found in the structure of the wall and/or cell membrane,<sup>27</sup> what was observed in the average spectra of isolates. Quintuplicates of each

isolate were read in different regions of the plate, since some did not grow homogeneously throughout the surface. These growth variations, which could bring a reproducibility problem, were corrected using 1 OSC component.

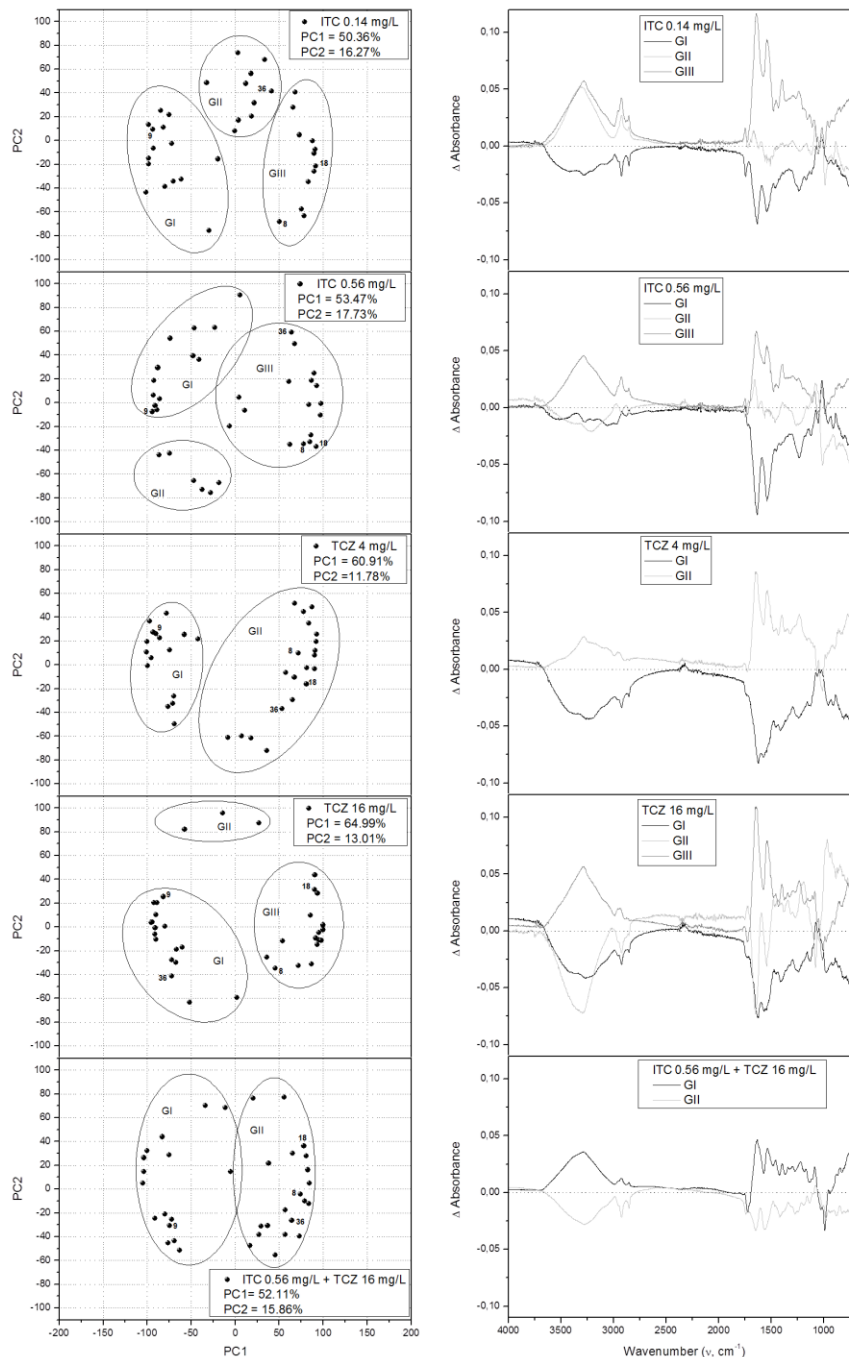
To the best of our knowledge, there are only five studies in literature that have used FTIR-ATR to determine microorganisms sensitive or resistant to certain drugs.<sup>17-20,33</sup> However, although they obtained promising results, these studies evaluated only the use with bacteria, for which there is already a greater standardization and a wide range of methods available for susceptibility testing.<sup>34</sup> Moreover, in none of these studies it was used a PLS model.

### **Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA)**

FTIR-ATR spectroscopy is often used to evaluate the changes that occur in microorganism cells in response to stressful conditions, in addition to the mode of action of antimicrobial compounds.<sup>35-37</sup> *F. pedrosoi* isolates were exposed to itraconazole and tricyclazole to study their metabolic adaptations. PCA and HCA are unsupervised classification methods, i.e., differentiate and group spectra without any prior knowledge about them.<sup>32</sup> The spectra of the difference between tests and standard treatment (control) were used to maximize the differences between isolates and assist in their grouping.

Scores plot of PCA first and second components showed that the isolates of *F. pedrosoi* grouped in different ways depending on the treatment received, in relation to the control, presenting at least three spectral morphotypes patterns. PC1 contained on average 56.36% of information and PC2 contained on average 14.93% of information in all treatments. Ellipses delimit the clusters formed by HCA.  $\Delta$ Absorbance graphs showed how groups differed between them and in relation to control in the absorbance in certain regions. In all groups the greatest difference found in relation to control was in the band  $1637\text{ cm}^{-1}$

(amide I) and in the band around 1550  $\text{cm}^{-1}$  (amide II), two of the main protein regions in the spectrum of *F. pedrosoi* (Figure 3).



**Figure 3.** Biplot PC1xPC2 of normalized mean centered FTIR spectral changes of sample set of *F. pedrosoi* grown on different concentrations of ITC and/or TCZ in Sabouraud agar. Clusters are according to HCA. Samples 8, 9, 18 and 36 have MIC = 32 mg/L. Δ Absorbance graphics shows the spectral differences of the clusters concerning to control, considered GI, GII and GIII.



Three groups with very distinct behavior were formed in treatments ITC 0.14 mg/L and 0.56 mg/L. There was a reduction of  $\Delta$ Absorbance in almost all regions of the spectrum in groups formed with ITC 0.56 mg/L in relation to ITC 0.14 mg/L. GIII presented similar characteristics in both treatments and GI and GII had larger variations. Fourteen isolates (numbers 2, 3, 7, 10, 12, 21, 22, 24, 27, 28, 30, 34, 36 and 38) switched groups with increased concentration of itraconazole. The growth of a microorganism in stressful but non-lethal conditions results in mechanisms of adaptation and modification of cellular structures.<sup>37</sup> Itraconazole inhibits 14- $\alpha$ -demethylase, an enzyme that converts lanosterol to ergosterol, a fundamental component of the cell membrane of fungi. This causes inhibition of growth and cell death.<sup>38</sup> Studies with *Aspergillus fumigatus* showed that this filamentous fungus was able to adapt its transcriptome in just 60 minutes after exposure to sublethal doses of itraconazole, leading to different adaptations such as alteration of expression of genes involved in ergosterol biosynthesis and phospholipids.<sup>39</sup> Still in studies with *Aspergillus*, 72 proteins were found to be more abundant during interaction with different antifungals.<sup>40</sup> Therefore, the exposure to an antifungal agent modifies the primary metabolism of the cell, leading to different and diverse adaptations that are not yet fully understood. This was observed in our study with *F. pedrosoi*, where exposure to itraconazole led to differences mainly in the composition of proteins and lipids in cells. However, the pattern of these changes was not clear and the great variation of isolates between the groups also shows that the response and adaptations of *F. pedrosoi* to itraconazole are complex.

In treatment with TCZ 4 mg/L and 16 mg/L it was formed two and three groups, respectively, which were similar in both concentrations. Group I had a similar absorption pattern with 4 mg/L and 16 mg/L and the isolates were all the same in both concentrations, except for the number 36 that migrated from group II in 4 mg/L to group I at 16 mg/L. Group II with 4 mg/L dismembered in two other groups with 16 mg/L. Three samples (19, 21 and

38) remained in group II and presented different  $\Delta$ Absorbance than the two other groups. The rest of the samples formed group III and showed an increase in absorbance in almost all regions compared to the treatment of 4 mg/L. Tricyclazole inhibits DHN-melanin production acting in two reduction stages in its biosynthesis pathway, specifically the reduction of 1,3,6,8-THN in scitalone and 1,3,8-THN in vermelone.<sup>41,42</sup> Melanin plays important roles in survival and defense of the fungus, but is not essential for its growth and development, constituting secondary metabolism.<sup>43</sup> Therefore, the response of the fungus to exposure to TCZ is more linear than that of the exposure to ITC, which can be seen in the greater regularity of the groups in treatments with TCZ and in the lower position exchange of the isolates between clusters.

Two groups with different behaviors were formed in treatment ITC 0.56 mg/L + TCZ 16 mg/L. Comparing the unique treatments of ITC 0.56 mg/L and TCZ 16 mg/L with their combined treatment, it is observed that the clustering of isolates in the latter was more similar with that of TCZ 16 mg/L than with that of ITC 0.56 mg/L. However, the groups presented a more dispersed configuration, with longer distances between isolates, because another condition of variation was created (the addition of itraconazole).

Samples number 8, 9, 18 and 36 are highlighted in Figure 3 and presented MIC = 32 mg/L, being the ones that are resistant to itraconazole. Samples 8, 9 and 18 showed similar behavior in all treatments; 8 and 18 were grouped and 9 were separated in all of them. Sample 36 was grouped with 8 and 18 in treatments ITC 0.56 mg/L, TCZ 4 mg/L and ITC 0.56 mg/L + TCZ 16 mg/L; grouped with 9 in treatment TCZ 16 mg/L and in a separate group in treatment ITC 0.14 mg/L; therefore, it was, among the resistant samples, the one that varied the most. In the average spectra of standard treatment, sample 9 is the one that most differs from others by presenting greater absorbance in the bands of 2920, 2850 and 1745  $\text{cm}^{-1}$  (lipids). Isolate 9 was also the one with the lowest position variation along PC1 and PC2 axes.

Samples 8, 18 and 36 had positive  $\Delta$ Absorbance in all single treatments and negative in combined treatment ITC+TCZ (except in treatment TCZ 16 mg/L sample 36 had negative behavior as well). Sample 9 had opposite behavior: negative  $\Delta$ Absorbance in all single treatments and positive in combined treatment ITC+TCZ.

Therefore, although it was observed some clusters of resistant isolates according to certain spectral characteristics, they are very subtle and variable to allow a classification based only on this criterion, as has already been verified in other studies of this type.<sup>17</sup> FTIR-ATR/PLS model was able to predict the MICs based on the spectra through the use of 1 OSC component, which removes information that has a low correlation with the outcome of interest. As in PCA analysis, this pretreatment is not used, all metabolic processes occurring in the fungal cell mask those who have high predictive value of MICs. The spectra of microorganisms are very complex, and it is necessary to use several data pretreatment techniques to obtain reliable results.<sup>32</sup> Our work was a preliminary study where about three patterns of spectral morphotypes of *F. pedrosoi* that have different behaviors when exposed to itraconazole and tricyclazole were described. Further studies with a larger number of isolates are necessary to deepen this knowledge.

The main advantages of the methodology proposed in our work are its ease of execution and its reduced cost compared to reference methods. As limitations is mentioned the need for an initial set of MIC values (calibration set), which must have been defined strictly following the standards of reference protocols to ensure a reliable prediction model. New samples with anomalous behavior should pass through the supervision method (M38) before they are included in the calibration spectral dataset for a new modeling update. Finally, the information obtained here (using Sabouraud agar cultivation) may not reflect the actual adaptations in RPMI 1640 medium or even under in vivo test conditions (where host defense mechanisms can generate other adaptation patterns in the presence of ITC). Studies of this

nature should be proposed to follow up on a more complete interpretation of the clinical repercussions of these results. It is concluded that FTIR-ATR associated with chemometrics allows the detection of metabolic adaptations in *F. pedrosoi* and quantify the degree of antifungal sensitivity under the challenge of itraconazole and/or tricyclazole. This technique can have positive impacts on clinical management of infections caused by *F. pedrosoi* and emerges as a promising alternative for studies of this nature with other filamentous fungi and other antifungal agents of clinical interest from the perspective of metabolomics.

## **FUNDING**

No specific funding has been received for this work.

## **TRANSPARENCY DECLARATIONS**

None to declare.

## **REFERENCES**

1. Santos ALS, Palmeira VF, Rozental S *et al.* Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31: 570–91.
2. Cunha MML, Franzen AJ, Seabra SH *et al.* Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: A trap for oxidative radicals. *BMC Microbiol* 2010; 10: 80.
3. Label M, Karayan LC, de Hoog S *et al.* Differential distribution patterns of *Fonsecaea* agents of chromoblastomycosis, exemplified by the first case due to *F. monophora* from Argentina. *Med Mycol Case Rep* 2018; 20: 35–8.
4. Queiroz-Telles F, de Hoog S, Santos DWCL *et al.* Chromoblastomycosis. *Clin Microbiol Rev* 2017; 30: 233–76.

5. World Health Organization. *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases*. Geneva: World Health Organization, 2010.
6. World Health Organization. *Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases*. Geneva: World Health Organization, 2013.
7. Queiroz-Telles F, de Almeida BM, Breda G *et al*. Therapeutic issues in patients with refractory chromoblastomycosis. *Mycoses* 2012; 55: 101–2.
8. Bonifaz A, Paredes-Solis V, Saul A. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5: 247–54.
9. Queiroz-Telles F, Purim KS, Fillus JN *et al*. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. *Int J Dermatol* 1992; 31: 805–12.
10. Alastruey-Izquierdo A, Melhem MSC, Bonfietti LX *et al*. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2015; 57: 57–64.
11. Revankar SG, Sutton DA. Melanized fungi in human disease. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 884–928.
12. Posteraro B, Sanguinetti M. The future of fungal susceptibility testing. *Future Microbiol* 2014; 9: 947–67.
13. Sanguinetti M, Posteraro B. New approaches for antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 2017; 23: 931–4.
14. Lamoth F, Alexander BD. Comparing Etest and broth microdilution for antifungal susceptibility testing of the most-relevant pathogenic molds. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 3176–81.
15. Balan V, Mihai C-T, Cojocaru F-D *et al*. Vibrational spectroscopy fingerprinting in

medicine: from molecular to clinical practice. *Materials* 2019; 12: 2884.

**16.** Bellisola G, Sorio C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am J Cancer Res* 2012; 2: 1–21.

**17.** Lechowicz Ł, Urbaniak M, Adamus-Białek W *et al.* The use of infrared spectroscopy and artificial neural networks for detection of uropathogenic *Escherichia coli* strains' susceptibility to cephalothin. *Acta Biochim Pol* 2013; 60: 713–8.

**18.** Sharaha U, Rodriguez-Diaz E, Sagi O *et al.* Fast and reliable determination of *Escherichia coli* susceptibility to antibiotics: Infrared microscopy in tandem with machine learning algorithms. *J Biophotonics* 2019; 12.

**19.** Salman A, Sharaha U, Rodriguez-Diaz E *et al.* Detection of antibiotic resistant: *Escherichia coli* bacteria using infrared microscopy and advanced multivariate analysis. *Analyst* 2017; 142: 2136–44.

**20.** Sharaha U, Rodriguez-Diaz E, Riesenber K *et al.* Using infrared spectroscopy and multivariate analysis to detect antibiotics' resistant *Escherichia coli* bacteria. *Anal Chem* 2017; 89: 8782–90.

**21.** Shookohi GR, Badali H, Mirhendi H *et al.* In vitro activities of luliconazole, lanoconazole, and efinaconazole compared with those of five antifungal drugs against melanized fungi and relatives. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61: e00635-17.

**22.** Daboit TC, Magagnin CM, Heidrich D *et al.* In vitro susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and to the combination of terbinafine and amphotericin B. *Mycoses* 2014; 57: 116–20.

**23.** Feng P, Najafzadeh MJ, Sun J *et al.* In vitro activities of nine antifungal drugs against 81 *Phialophora* and *Cyphellophora* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 6044–7.

**24.** 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:

1636–8.

25. Heidrich D, Alves K de O, Scroferneker ML. Melanin biosynthesis inhibition affects the susceptibility to antifungals in chromoblastomycosis agents. Unpublished results.
26. ASTM. *Annual Book of ASTM Standards, Standards Practices for Infrared, Multivariate, Quantitative Analysis, ASTM International E1655-05*. Pennsylvania: West Conshohocken; 2005.
27. Naumann D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. In: Meyers R A, ed. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000; 102–31.
28. Nie M, Luo J, Xiao M *et al*. Structural differences between *Fusarium* strains investigated by FT-IR spectroscopy. *Biochem* 2007; 72: 61–7.
29. Salman A, Lapidot I, Pomerantz A *et al*. Identification of fungal phytopathogens using Fourier transform infrared-attenuated total reflection spectroscopy and advanced statistical methods. *J Biomed Opt* 2012; 17: 017002.
30. Lecellier A, Mounier J, Gaydou V *et al*. Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *Int J Food Microbiol* 2014; 168–169: 32–41.
31. Salman A, Tsror L, Pomerantz A *et al*. FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes. *Spectroscopy* 2010; 24: 261–7.
32. Wenning M, Scherer S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: Perspectives and limitations of the method. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97: 7111–20.
33. Sockalingum GD, Bouhedja W, Pina P *et al*. ATR-FTIR spectroscopic investigation of imipenem-susceptible and -resistant *Pseudomonas aeruginosa* isogenic strains. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232: 240–6.
34. Khan ZA, Siddiqui MF, Park S. Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. *Diagnostics* 2019; 9: 49.

35. Biswas D, Tiwari M, Tiwari V. Molecular mechanism of antimicrobial activity of chlorhexidine against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 2019; 14: e0224107.
36. Booyens J, Thantsha MS. Fourier transform infra-red spectroscopy and flow cytometric assessment of the antibacterial mechanism of action of aqueous extract of garlic (*Allium sativum*) against selected probiotic *Bifidobacterium* strains. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14: 289.
37. Alvarez-Ordóñez A, Halisch J, Prieto M. Changes in Fourier transform infrared spectra of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis after adaptation to stressful growth conditions. *Int J Food Microbiol* 2010; 142: 97–105.
38. Piérard G, Arrese J, Piérard-Franchimont C. Itraconazole. *Expert Opin Pharmacother*. 2000; 1: 287–304.
39. Hokken M, Zoll J, Coolen J, Zwaan B, Verweij P, Melchers W. Phenotypic plasticity and the evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*; an expression profile of clinical isolates upon exposure to itraconazole. *BMC Genomics* 2019; 20: 28.
40. Shishodia S, Tiwari S, Shankar J. Resistance mechanism and proteins in *Aspergillus* species against antifungal agents. *Mycology* 2019; 10: 151–65.
41. Tokousbalides MC, Sisler HD. Site of inhibition by tricyclazole in the melanin biosynthetic pathway of *Verticillium dahliae*. *Pestic Biochem Physiol* 1979; 11: 64–73.
42. Stipanovic RD, Wheeler MH. Accumulation of 3,3'-biflaviolin, a melanin shunt product, by tricyclazole-treated *Thielaviopsis basicola*. *Pestic Biochem Physiol* 1980; 13: 198–201.
43. Bell AA, Wheeler MH. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu Rev Phytopathol* 1986; 24: 411–51.



## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho foi o primeiro estudo a propor a utilização de FTIR-ATR associada à quimiometria para determinação da suscetibilidade de um fungo filamentosos a um agente antifúngico. Esta plataforma analítica já tem se mostrado como uma alternativa rápida e de baixo custo para implementação em rotinas microbiológicas em substituição a métodos convencionais.

Este resultado não estava englobado nos objetivos iniciais do projeto. Porém, à medida que foi se desenvolvendo o trabalho, tentamos aproximar os resultados da prática clínica. Apesar de ser importante, o estudo das adaptações metabólicas de *F. pedrosoi* por si só não tem aplicação direta na melhora do manejo de pacientes com cromoblastomicose. No entanto, se essas adaptações são correlacionadas com algo como a suscetibilidade ao itraconazol, o antifúngico mais utilizado no tratamento, esses resultados podem ter de fato uma aplicação prática.

Para isso, utilizamos os resultados dos ensaios de suscetibilidade obtidos em outros estudos de nosso grupo de pesquisa, destacando a colaboração do grupo e a continuidade dos trabalhos desenvolvidos, gerando dados fundamentais acerca da cromoblastomicose e de seus principais agentes.

## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

São elencadas as seguintes perspectivas futuras para ampliar os resultados obtidos neste trabalho, utilizando FTIR-ATR:

- Propor o modelo FTIR-ATR/PLS para predição das concentrações inibitórias mínimas do itraconazol para outros agentes etiológicos da CBM;
- Propor o modelo FTIR-ATR/PLS para predição das concentrações inibitórias mínimas de outros antifúngicos importantes no tratamento da CBM;
- Estudar as adaptações metabólicas de *F. pedrosoi* com uso de agentes antifúngicos de outras classes, que apresentam mecanismos de ação diferentes do itraconazol.