

FERNANDA SIMAS CORRÊA BIANCALANA

***AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE HIFAS E CONÍDIOS
DE FUNGOS DEMÁCEOS FRENTE AOS ANTIFÚNGICOS
ANFOTERICINA B, ITRACONAZOL E VORICONAZOL E
TERBINAFINA, E A ÚLTIMA EM COMBINAÇÃO COM OS
DEMAIS ANTIFÚNGICOS***

CAMPINAS

2011

FERNANDA SIMAS CORRÊA BIANCALANA

AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE HIFAS E CONÍDIOS DE FUNGOS DEMÁCEOS FRENTE AOS ANTIFÚNGICOS ANFOTERICINA B, ITRACONAZOL E VORICONAZOL E TERBINAFINA, E A ÚLTIMA EM COMBINAÇÃO COM OS DEMAIS ANTIFÚNGICOS

Tese de doutorado apresentada à Comissão de pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER

CAMPINAS

UNICAMP

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

B47a Biancalana, Fernanda Simas Corrêa
 Avaliação da suscetibilidade de hifas e conídios de fungos
 demáceos frente aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e
 voriconazol e terbinafina, e a última em combinação com os demais
 antifúngicos / Fernanda Simas Corrêa Biancalana. -- Campinas, SP :
 [s.n.], 2011.

 Orientador : Angélica Zaninelli Schreiber
 Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
 de Ciências Médicas.

 1. Fungos. 2. Teste de suscetibilidade. 3. Antifúngicos. I.
 Schreiber, Angélica Zaninelli. II. Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em Inglês: Evaluation of susceptibility of hyphae and conidia of dematiaceous molds to antifungal agent amphotericin B, itraconazole and voriconazole and terbinafine, and last in combination with the other antifungal agents

Keywords: • Molds
 • Susceptibility tests
 • Antifungal

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Área de Concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

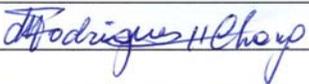
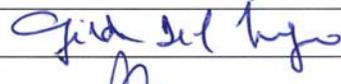
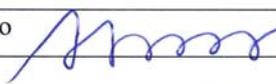
Prof. Dr. Angélica Zaninelli Schreiber
Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho
Prof. Dr. Plínio Trabasso
Prof. Dr. Marilene Rodrigues Chang
Prof. Dr. Gilda Maria Barbaro Del Negro

Data da defesa: 18.02.2011

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Fernanda Simas Corrêa Biancalana

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Angélica Zaninelli Schreiber

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Marilene Rodrigues Chang	
Professor (a) Doutor (a) Gilda Maria Barbaro Del Negro	
Professor (a) Doutor (a) Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho	
Professor (a) Doutor (a) Plínio Trabasso	
Professor (a) Doutor (a) Angélica Zaninelli Schreiber	

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/02/2011

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À minha família que me apoiou em todos os momentos da minha vida.

Ao meu marido, Adriano, por todo amor e compreensão e por sempre me apoiar de forma incondicional ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber meus mais profundos agradecimentos pela oportunidade, confiança, amizade e dedicação.

À Luzia Lyra pela amizade, respeito, dedicação e conselhos.

Ao Edson Luz pela amizade, respeito, dedicação e conselhos.

À Fernanda Nascimento pela amizade conterrânea.

À Lola, por ser minha companheira e minha sombra.

Aos meus colegas de Pós-graduação principalmente Ana Paula, Aline, Fernanda, Gabriela, Michela e Vanessa e aos docentes do DPC- FCM-UNICAMP.

Aos funcionários Érivan e Fred do Laboratório de Epidemiologia Molecular em fungos da FCM-Unicamp, pela amizade e carinho.

Às secretárias Regina e Márcia, pela ajuda com toda a parte burocrática.

Aos meus amigos inseparáveis Wiliam, Júlio, Flávia, Bella, Mila e Alessandra que me ajudaram a manter sempre o bom humor.

A CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

A todas as pessoas que deixo de citar, mas que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

O meu profundo agradecimento!

*"Na vida, não vale tanto o
que temos, nem tanto importa o que somos.
Vale o que realizamos com aquilo
que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós!"
(Emmanuel)*

SUMÁRIO

	<i>Pág</i>
RESUMO	15
ABSTRAT	17
1. INTRODUÇÃO GERAL	19
1.1 Fungos demáceos como agentes de infecções humanas	20
1.1.1 Cromoblastomicose	20
1.1.2 Eumicetomas	21
1.1.3 Feo-hifomicoses	21
1.2 Diagnóstico de infecções causadas por fungos demáceos	22
1.2.1 Isolamento de fungos demáceos	22
1.2.2 Identificação de fungos demáceos	22
1.3 Tratamento de infecções causadas por fungos demáceos	24
1.4 Testes de suscetibilidade a antifúngicos para fungos filamentosos	25
1.4.1 Técnica de microdiluição em caldo	25
1.4.2 Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos utilizando hifas	29
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	35
4. CAPÍTULOS	37
4.1. Artigo 1 - “Avaliação <i>in vitro</i> do tipo de interação obtida através da combinação de terbinafina com itraconazol, voriconazol ou anfotericina B frente a fungos demáceos. “... 39	39
4.2. Artigo 2 – “Avaliação da suscetibilidade de terbinafina isoladamente em em combinação com anfotericina B, itraconazol e voriconazol frente a conídios e hifas de fungos demáceos.”.....	48
5. DISCUSSÃO GERAL	65

5.1. Avaliação da suscetibilidade dos conídios dos isolados de fungos demáceos selecionados frente aos antifúngicos não combinados: terbinafina, itraconazol, voriconazol, e anfotericina B, através da técnica de microdiluição em caldo	66
5.2. Avaliação da suscetibilidade dos conídios dos isolados de fungos demáceos selecionados frente a associação do antifúngico terbinafina com itraconazol, voriconazol, e anfotericina B, através da técnica de microdiluição em caldo com a utilização da metodologia do tabuleiro de xadrez.....	67
5.3. Avaliação da suscetibilidade das hifas dos isolados de fungos demáceos selecionados frente aos antifúngicos puros: terbinafina, itraconazol, voriconazol, e anfotericina B, através da avaliação dinâmica de crescimento.....	69
5.4. Avaliação da suscetibilidade das hifas dos isolados de fungos demáceos selecionados frente a associação do antifúngico terbinafina com itraconazol, voriconazol, e anfotericina B, através da avaliação dinâmica de crescimento.....	72
6. CONCLUSÕES.....	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
8. ANEXOS.....	85
8.1 – Anexo 1.....	86
8.2 – Anexo 2.....	87
8.3 – Anexo 3.....	88
8.4 – Anexo 4.....	89
8.5 – Anexo 5.....	90
8.6 – Anexo 6.....	91
8.7 – Anexo 7.....	92
8.8 – Anexo 8.....	93
8.9 – Anexo 9.....	94
8.10– Anexo 10.....	95
8.11 – Anexo 11.....	96
8.12 – Anexo 12.....	97

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>Português</i>	<i>Inglês</i>	
—	BCT	BioCell-Tracer
CIM	MIC	Concentração inibitória mínima
CFM	MIF	Concentração Fungicida Mínima
—	CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	—	dimetilsulfóxido
—	MOPS	ácido morfolinepropanesulfônico
UFC	—	unidade formadora de colônia
ASD	—	agar Sabouraud dextrose
ABD	—	agar batata dextrose
LIF	—	Laboratório de Investigação em Fungos-DPC-FCM
—	PLL	Poli-L-Lisine
—	SAAMF	meio sintético de aminoácidos para fungos
CIF	FIC	Concentração Inibitória Fracional
—	TERB	terbinafina
—	VOR	voriconazol
—	AMB	anfotericina B
—	ITZ	itraconazol

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1: Artigo 1, tabela 1: Minimal inhibitory concentrations of terbinafine isolated and in combination with itraconazole, imphotericin B and voriconazole and calculated Interactions for the 29 clinical isolates of dematiaceous molds included in the study.	47
TABELA 2: Artigo 2, tabela 1: Growth inhibition rate (GIR) of decreasing concentrations of voriconazole, itraconazole, amphotericin B and terbinafine alone for dematiaceous molds in the exposure and post exposure periods.	61
TABELA 3: Artigo 2, tabela 2: MIC and MIF values obtained to conidia using broth microdilution and MIC values and growth inhibition rates obtained in the antifungal post exposure period to hyphae.	62
TABELA 4: Artigo 2, tabela 3: Growth inhibition rate to dematiaceous molds in the exposure and post-exposure to antifungals period.	63
TABELA 5: Artigo 2, tabela 4: Interaction of conidia and hyphal forms of dematiaceous molds to a combination of antifungal agents.	64
TABELA 6: Anexo 1: Padronização do teste no sistema automatizado BioCell-Tracer para os gêneros de fungos demáceos avaliados.	86
TABELA 7: Anexo 12: Taxa de inibição de crescimento dos isolados selecionados frente a associação de anfotericina B + terbinafina com interferência na ordem de adição nos períodos de exposição e pós-exposição ao antifúngico. na avaliação dinâmica de crescimento.	97
TABELA 8: Anexo 12: Taxa de inibição de crescimento dos isolados selecionados frente a associação de itraconazol + terbinafina com interferência na ordem de adição nos períodos de exposição e pós-exposição ao antifúngico. na avaliação dinâmica de crescimento.	98
TABELA 9: Anexo 12: Taxa de inibição de crescimento dos isolados selecionados frente a associação de voriconazol + terbinafina com interferência na ordem de adição nos períodos de exposição e pós-exposição ao antifúngico. na avaliação dinâmica de crescimento.	99

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1: Fotografia de alguns dos gêneros de fungos demáceos mais frequentemente isolados.	23
FIGURA 2: Exemplo da montagem da placa na metodologia de tabuleiro de xadrez, para a associação de antifúngicos.	28
FIGURA 3: Fotografia do aparelho BioCell-Tracer.	31
FIGURA 4: Imagem da tela do monitor do Biocell-Tracer	32
FIGURA 5: Representação esquemática da monitorização de crescimento da hifa:	32
FIGURA 6: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF359 (<i>Curvularia clavata</i>) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de terbinafina.	87
FIGURA 7: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF706 (<i>Fonsecaea pedrosoi</i>) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de terbinafina	87
FIGURA 8: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF89 (<i>Alternaria</i> sp) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de terbinafina.	87
FIGURA 9: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado BipIAL (<i>Bipolaris</i> sp) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de terbinafina.	87
FIGURA 10: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado CladBoldrini1 (<i>Cladophialophora bantiana</i>) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de terbinafina	87
FIGURA 11: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF327 (<i>Exophiala jeanselmei</i>) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de terbinafina.	87
FIGURA 12: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF359 (<i>Curvularia clavata</i>) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B.	88
FIGURA 13: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF706 (<i>Fonsecaea pedrosoi</i>) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B.	88
FIGURA 14: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF89 (<i>Alternaria</i> sp) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B.	88
FIGURA 15: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado BipIAL (<i>Bipolaris</i> sp) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B.	88
FIGURA 16: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado CladBoldrini1 (<i>Cladophialophora bantiana</i>) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B.	88
FIGURA 17: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF327 (<i>Exophiala jeanselmei</i>) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B.	88

- FIGURA 18:** Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF359 (*Curvularia clavata*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de voriconazol. 89
- FIGURA 19:** Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF706 (*Fonsecaea pedrosoi*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de voriconazol. 89
- FIGURA 20:** Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF89 (*Alternaria* sp) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de voriconazol. 89
- FIGURA 21:** Avaliação da inibição de crescimento para o isolado BipIAL (*Bipolaris* sp) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de voriconazol. 89
- FIGURA 22:** Avaliação da inibição de crescimento para o isolado CladBoldrini1 (*Cladophialophora bantiana*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de Voriconazol. 89
- FIGURA 23:** Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF327 (*Exophiala jeanselmei*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de Voriconazol. 89
- FIGURA 24:** Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF359 (*Curvularia clavata*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de itraconazol 90
- FIGURA 25:** Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF706 (*Fonsecaea pedrosoi*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de itraconazol. 90
- FIGURA 26:** Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF89 (*Alternaria* sp) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de itraconazol. 90
- FIGURA 27:** Avaliação da inibição de crescimento para o isolado BipIAL (*Bipolaris* sp) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de itraconazol. 90
- FIGURA 28:** Avaliação da inibição de crescimento para o isolado CladBoldrini1 (*Cladophialophora bantiana*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de itraconazol. 90
- FIGURA 29:** Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF327 (*Exophiala jeanselmei*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de itraconazol. 90
- FIGURA 30:** Representação gráfica da associação: anfotericina B + terbinafina frente a *C. clavata* 91
- FIGURA 31:** Representação gráfica da associação: itraconazol + terbinafina frente a *C. clavata* 91
- FIGURA 32:** Representação gráfica da associação: voriconazol + terbinafina frente a *C. clavata* 91
- FIGURA 33:** Representação gráfica da associação: anfotericina B + terbinafina frente a *F. pedrosoi* 92
- FIGURA 34:** Representação gráfica da associação: itraconazol + terbinafina frente a *F. pedrosoi* 92

- FIGURA 35:** Representação gráfica da associação: voriconazol + terbinafina frente a *F. pedrosoi* 92
- FIGURA 36:** Representação gráfica da associação: anfotericina B + terbinafina frente a *A. alternata* 93
- FIGURA 37:** Representação gráfica da associação: itraconazol B + terbinafina frente a *A. alternata* 93
- FIGURA 38:** Representação gráfica da associação: voriconazol B + terbinafina frente a *A. alternata* 93
- FIGURA 39:** Representação gráfica da associação: anfotericina B + terbinafina frente a *Bipolaris sp* 94
- FIGURA 40:** Representação gráfica da associação: itraconazol + terbinafina frente a *Bipolaris sp* 94
- FIGURA 41:** Representação gráfica da associação: voriconazol + terbinafina frente a *Bipolaris sp* 94
- FIGURA 42:** Representação gráfica da associação: anfotericina B + terbinafina frente a *C. bantiana* 95
- FIGURA 43:** Representação gráfica da associação: itraconazol + terbinafina frente a *C. bantiana* 95
- FIGURA 44:** Representação gráfica da associação: voriconazol + terbinafina frente a *C. bantiana* 95
- FIGURA 45:** Representação gráfica da associação: anfotericina B + terbinafina frente a *E. jeanselmei* 96
- FIGURA 46:** Representação gráfica da associação: itraconazol + terbinafina frente a *E. jeanselmei* 96
- FIGURA 47:** Representação gráfica da associação: voriconazol + terbinafina frente a *E. jeanselmei* 96

RESUMO

Nos últimos anos, os fungos demáceos têm sido intensamente reconhecidos como importantes patógenos, principalmente em pacientes imunocomprometidos, sendo reportadas como patogênicas mais de 100 espécies de 60 diferentes gêneros. O tratamento das infecções causadas por estes fungos é difícil, bastante demorado e algumas vezes sem sucesso, portanto, se fazem necessários mais estudos sobre a suscetibilidade destes patógenos a antifúngicos *in vitro*. Alguns autores têm demonstrado a excelente eficácia *in vivo* da terbinafina, em combinação com outros antifúngicos, para o tratamento destas infecções, porém são poucos os que avaliam seu efeito *in vitro* isoladamente, e menos ainda os relatos sobre associação desta com outros antifúngicos. A maioria dos trabalhos utiliza apenas o inóculo com conídios, que não é a principal morfologia do fungo encontrada no paciente. A realização de testes utilizando hifas poderia mimetizar as características do fungo no tecido infectado, demonstrando melhor o potencial terapêutico do antifúngico. Existem poucos relatos na literatura sobre avaliação dinâmica de crescimento de fungos, e nenhum deles realizado com fungos demáceos. Partindo deste princípio, foi investigada neste estudo a suscetibilidade *in vitro* de conídios e hifas fungos demáceos dos gêneros *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladophialophora*, *Curvularia*, *Exophiala* e *Fonsecaea* frente a anfotericina B, itraconazol e voriconazol e terbinafina, e esta última em combinação com os demais antifúngicos através da metodologia do tabuleiro de xadrez e avaliação dinâmica de crescimento. Quando avaliados isoladamente, o voriconazol foi o antifúngico mais ativo, seguido de itraconazol, terbinafina e anfotericina B, utilizando conídios. Quando foi feita a associação, os resultados indicaram 100% de sinergismo nas interações entre terbinafina e voriconazol, 96,5% de sinergismo entre anfotericina B e terbinafina e 75,9% de sinergismo entre terbinafina e itraconazol. Nenhum caso de antagonismo foi observado. Voriconazol e itraconazol demonstraram maior atividade frente a hifas dos isolados avaliados, seguidos de terbinafina e anfotericina B. Os isolados de *C. bantiana* e *F. pedrosoi* demonstraram altos valores de CIM frente a anfotericina B. Os valores de CIM obtidos para as hifas foram menores que os dos conídios, chegando a duas ou quatro diluições abaixo do valor da CIM. Os resultados demonstraram 100% de sinergismo entre a terbinafina e os azólicos ou a anfotericina quando utilizadas hifas no sistema BCT. Concluindo, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a forma de hifas dos isolados avaliados é mais suscetível que a de conídios frente aos antifúngicos avaliados tanto isoladamente, como em associação.

ABSTRACT

In recent years, the dematiaceous fungi have been widely recognized as important pathogens, especially in immunocompromised patients, being reported as pathogenic, more than 100 species of 60 different genera. Treatment of infections caused by these fungi is difficult, time consuming and sometimes without success, therefore, more studies are needed about the susceptibility of the pathogens to antifungal agents *in vitro*. Some studies have demonstrated excellent *in vivo* efficacy of terbinafine in combination with other antifungals to treat these infections, but few ones have evaluated the *in vitro* effect of terbinafine alone, and even less are about association with other antifungal agents. Most used only the inoculum with conidia, which is not the essential morphology of the fungus found in the patient. Testing susceptibility using hyphae could mimic the characteristics of the fungus in infected tissue, demonstrating more clearly the therapeutic potential of the antifungal agent. There are few reports in the literature on dynamic evaluation of mold growth, and none of them performed with dematiaceous fungi. With this assumption, was investigated in this study the *in vitro* susceptibility of terbinafine alone and in combination with amphotericin, itraconazole and voriconazole against conidia and hyphae of dematiaceous fungi belonging to genera: *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladophialophora*, *Curvularia*, *Exophiala* and *Fonsecaea*, using the checkerboard methodology and evaluation of dynamic growth. When evaluated alone, voriconazole was the most active antifungal agent, followed by itraconazole, terbinafine and amphotericin B, using the broth microdilution method with conidia. In the association, the results indicated 100% of synergism in interactions between voriconazole and terbinafine, 96.5% of synergism between amphotericin and terbinafine and 75.9% of synergism between terbinafine and itraconazole. No case of antagonism was observed. Voriconazole and itraconazole demonstrated the highest activity with the use of BCT with hyphae of isolates evaluated, followed by terbinafine and amphotericin B. Isolates of *C. bantiana* and *F. pedrosoi* showed higher MIC values compared to amphotericin B. MIC values obtained for hyphae were lower than those of conidia two or four dilutions below the MIC value. The results demonstrated 100% synergistic interactions between terbinafine and azoles or amphotericin when testing hyphae in BCT system. In conclusion, the present results suggest that the hyphae form of tested isolates are more susceptible than conidia to the antifungal agent evaluated alone or in combination.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fungos demáceos como agentes de infecções humanas

Os fungos demáceos são comumente encontrados no solo e na vegetação de todas as regiões do planeta, principalmente em climas tropicais e subtropicais (1,2,3). A principal característica destes microrganismos é a presença de melanina em suas células, conferindo às suas hifas e esporos uma coloração castanha (1,2).

A presença de melanina também constitui um importante fator de virulência para estes fungos (1). Nos últimos anos estes fungos têm sido intensamente reconhecidos como importantes patógenos, principalmente em pacientes imunocomprometidos (1,2,4). Mais de 100 espécies de 60 diferentes gêneros de fungos demáceos já foram reportadas como patogênicas (1). Dentre elas, as mais frequentes são dos gêneros: *Curvularia*, *Exophiala*, *Bipolaris*, *Drechslera*, *Cladosporium*, *Cladophilalophora*, *Phialophora*, *Alternaria* e *Exserohilum* (5).

As doenças causadas por fungos demáceos são tipicamente distinguidas através de estudos histológicos em: cromoblastomicose, eumicetoma e feo-hifomicoses (1).

1.1.1. Cromoblastomicose

A cromoblastomicose é uma infecção micótica crônica, de evolução lenta, que acomete a pele e o tecido celular subcutâneo. Normalmente as lesões se localizam nos membros inferiores, principalmente nos pés e pernas e os indivíduos do sexo masculino, principalmente trabalhadores rurais (6).

O diagnóstico laboratorial da cromomicose é embasado na observação microscópica e cultura de material clínico suspeito. O exame histopatológico é de grande importância, pois partes mais profundas da pele são retiradas através de biópsia, aumentando assim, a possibilidade do encontro de estruturas fúngicas chamadas de corpos fumagóides (3). As espécies de fungos demáceos que têm sido relatadas como principais causadoras de

cromoblastomicose são: *Fonsecae pedrosoi*, *Fonsecae compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora carrionii* e *Rhinocladiella aquaspersa* (1,2,3,6,7).

1.1.2. Eumicetomas

Os eumicetomas são infecções crônicas, de pele e tecido subcutâneo, caracterizadas inicialmente por lesões nodulares subcutâneas, que, por sua vez progridem e, com o passar do tempo, fistulizam e drenam uma secreção contendo grãos parasitários (6).

O diagnóstico laboratorial dos eumicetomas tem como base a observação à microscopia de luz, dos grãos ou grânulos, que são constituídos de hifas castanhas septadas (1,2,3,7).

As principais espécies de fungos demáceos envolvidas em casos de micetomas são: *Madurella micetomatis*, *Exophialia jeanselmei*, *Curvularia lunata* e *Leptosphaeria senegalensis* (1,2,3,6,7).

1.1.3. Feo-hifomicoses

A designação feo-hifomicoses foi instituída por Ajello, em 1974, para denominar infecções cutâneas, subcutâneas e sistêmicas, causadas por uma grande variedade de fungos demáceos (1). A feo-hifomicose é uma infecção cosmopolita, que acomete tanto indivíduos saudáveis como imunocomprometidos (3,6).

Cada espécie de fungo demáceo envolvida pode demonstrar uma predileção por diferentes órgãos, podendo causar infecção no Sistema Nervoso Central, lesões subcutâneas, sinusites, pneumonia ou até infecção disseminada (5).

O exame micológico direto, a cultura e o exame histopatológico de material coletado de lesão são essenciais para o diagnóstico. No exame direto, feito em lâmina-lamínula com KOH (10-40%) são facilmente observadas hifas demáceas de aspecto torulóide. No exame histopatológico, o fungo se encontra sob a forma de hifas septadas e demáceas, isoladas ou agrupadas (6).

Um grande número de gêneros tem sido relacionado com quadros clínicos de feohifomicoses, destacando-se os gêneros *Aureobasidium*, *Bipolaris*, *Chaetomonium*, *Cladosporium*, *Cladophialophora*, *Curvularia*, *Exophialia* e *Alternaria* (1,2,5,6,7).

1.2. Diagnóstico de infecções causadas por fungos demáceos

1.2.1. Isolamento de fungos demáceos

O isolamento dos agentes causais se caracteriza como uma grande dificuldade (1,3). A partir do material clínico é realizado um exame micológico direto a fresco, com o material entre lâmina e lamínula, para a observação das estruturas fúngicas, e também uma cultura em agar Sabouraud ou agar batata dextrose, para a observação da colônia e das estruturas de reprodução (3,6).

Os fungos demáceos também aparecem muitas vezes como contaminantes em algumas culturas, complicando a identificação do agente causal (1).

1.2.2. Identificação de fungos demáceos

Além do crescimento lento e dificuldade na esporulação, estes fungos ainda possuem uma taxonomia complexa, com um grande número de variáveis (2).

Para realizar a identificação do microrganismo, é necessária a junção dos resultados obtidos no exame direto, cultura e muitas vezes um exame histopatológico, obrigando o clínico, na maioria dos casos, a iniciar o tratamento sem ter a identificação do agente, devido a demora do diagnóstico final (3,6).

Os fungos demáceos apresentam em exame direto hifas pardas, porém, não é possível identificar o gênero, sendo necessária a realização da cultura em agar (3,6). O gênero *Alternaria*, apresenta em cultura coloração verde acinzentada, e os conídios com septos longitudinais e transversais e, na maioria das vezes, dispostos em cadeia (3) (Figura 1A). O

gênero *Bipolaris* apresenta colônia de coloração cinza, e conidióforos longos, com conídios grandes, de 3 a 5 septos, dependendo da espécie (3) (Figura 1B). O gênero *Cladophialophora* possui colônia de coloração cinza enegrecida, e conidióforos curtos, de onde saem longas cadeias de conídios pequenos (3) (Figura 1C). O gênero *Curvularia* possui coloração cinza, e conióforos longos, conídios curvados com 3 septos (3) (Figura 1D). O gênero *Exophiala* apresenta quando jovem, a colônia amarelada com pequenas células com a aparência de leveduras e, depois de alguns dias surgem conídios pequenos e ovais que brotam a partir de conidióforos longos e a colônia adquire coloração cinza esverdeada (3) (Figura 1E). E o gênero *Fonsecaea* possui coloração cinza escuro aveludado, conidióforos curtos podendo ser septados ou não, e conídios ovais pequenos (3) (Figura 1F).

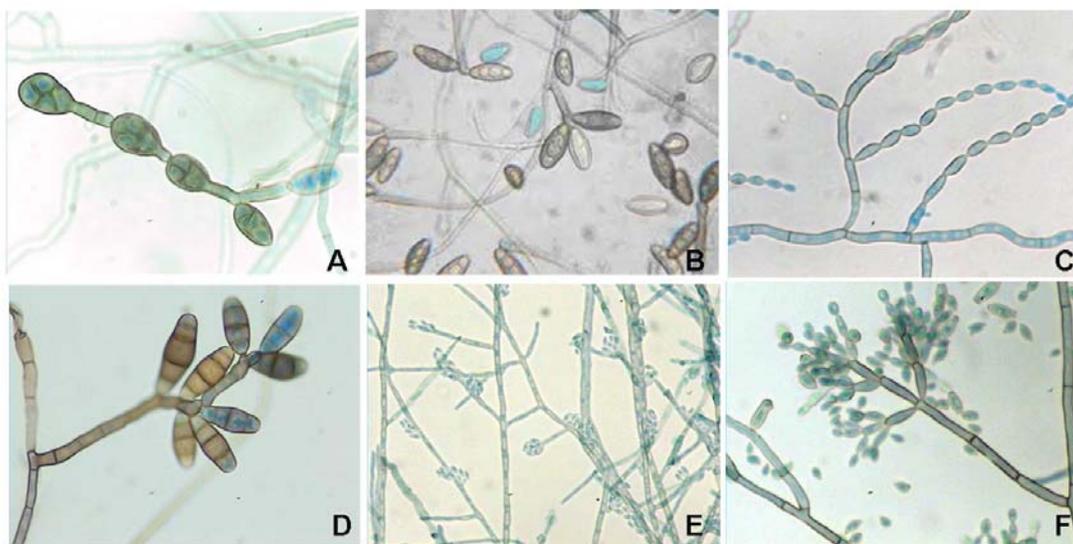


FIGURA 1: Fotografia de alguns dos gêneros de fungos demáceos mais frequentemente isolados. **A:** *Alternaria*, **B:** *Bipolaris*, **C:** *Cladophialophora*, **D:** *Curvularia*, **E:** *Exophiala*, **F:** *Fonsecaea* (Fotos LIF).

Algumas técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), estão sendo estudadas com objetivo de estabelecer um diagnóstico mais preciso, contudo, ainda não são aplicáveis na rotina diagnóstica hospitalar (1).

1.3. Tratamento de infecções causadas por fungos demáceos

A maioria dos estudos consideram os azólicos como medicamento de escolha para o tratamento das infecções causadas por fungos demáceos (7,8,9,10,11), entretanto, o uso da terbinafina tem sido destacado por alguns autores (4,12).

A cromoblastomicose é umas das infecções fúngicas mais difícil de ser tratada (6,13). O tratamento é longo e podem ocorrer recidivas, portanto, cabe ao clínico escolher o tratamento adequado, utilizando um ou mais medicamentos (iodeto de potássio, anfotericina B, itraconazol), associados ou não a outros métodos como: remoção cirúrgica, termoterapia e crioterapia (2,6). Alguns autores têm publicado bons resultados na associação de terbinafina com derivados azólicos (4,7,13).

O tratamento dos eumicetomas é muito demorado e os pacientes respondem de forma pouco eficiente à terapêutica com drogas antifúngicas. Tem sido relatado relativo sucesso no tratamento de eumicetomas com itraconazol, cetoconazol e anfotericina B (1,7). Outra medida terapêutica consiste na exérese cirúrgica, que deve ser indicada nos casos iniciais, quando se observam nódulos ou placas, sem comprometimento ósseo (6).

Casos de feo-hifomicose são de tratamento difícil, bastante variável e depende do tipo e localização da lesão, bem como da espécie fúngica envolvida (1,2,6,7). Na forma subcutânea, o tratamento cirúrgico pode ser suficiente para curar o paciente com lesões localizadas. Entretanto, em lesões extensas ou em pacientes imunossuprimidos, recomenda-se o uso de anfotericina B ou 5-fluorocitosina (6). No tratamento da feo-hifomicose sistêmica, recomenda-se o uso da anfotericina B. Outros medicamentos como o itraconazol e o fluconazo, estão sendo investigados como opções em terapêuticas prolongadas (7).

Em alguns casos, quando não há resposta para o tratamento de infecções causadas por fungos demáceos com antifúngicos utilizados isoladamente, a associação de antifúngicos pode ser considerada uma alternativa para aumentar a efetividade de cada droga, utilizando

assim dosagens menores de cada uma delas (12). Em adição, a associação de antifúngicos também poderia ser utilizada com objetivo de prevenir a emergência de fungos patogênicos resistentes *in vivo* (14).

1.4. Testes de suscetibilidade a antifúngicos para fungos filamentosos

1.4.1. Técnica de microdiluição em caldo

A técnica de microdiluição em caldo tem como princípio expor um inóculo definido do microrganismo em estudo a conhecidas concentrações da droga a ser avaliada, em condições que suportem o crescimento do microrganismo e, pouco ou nada, interfiram com a atuação da droga. A leitura final dos testes permite definir a menor concentração da droga que inibe o crescimento visível (concentração inibitória mínima – CIM) ou que mata o microrganismo problema (concentração fungicida mínima – CFM) (15).

No ano de 2008, o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) lançou o documento M38-A2 (16) padronizando testes de suscetibilidade para fungos filamentosos que causam infecções invasivas, tais como as espécies *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Pseudallescheria boydii* (*S.apiospermum*), *S. prolificans*, a forma miceliana de *Sporothrix schenckii*, zigomicetos, dermatófitos e fungos demáceos, representando um importante passo para o estabelecimento de uma técnica confiável, padronizada e viável.

A grande maioria dos estudos publicados que buscam avaliar a suscetibilidade *in vitro* de fungos demáceos são anteriores a 2008/2009, quando houve o lançamento da versão M38-A2 do documento do CLSI, tendo sido realizados a partir de diferentes adaptações no documento M-38A do CLSI. Sendo assim os valores de CIM obtidos para diferentes espécies de fungos demáceos são muito discrepantes, devido principalmente a variações no meio de cultura, concentração de inóculo, tempo e temperatura de incubação. Somente será possível

avaliar a aplicação do CLSI M38-A2 para fungos demáceos quando houver um número expressivo de publicações posteriores a 2009.

Alguns dos estudos sobre suscetibilidade *in vitro* de fungos demáceos avaliam a ação de antifúngicos como itraconazol, voriconazol e anfotericina B (4,14,17,18). Também há outros estudos *in vitro* com o uso de equinocandinas, demonstrando alguma atividade frente a isolados de *Curvularia* spp., *Bipolaris* spp. e *F. pedrosoi* (1,19). Algumas espécies são conhecidas por alguns relatos de resistência *in vitro* a anfotericina B, como *Curvularia* spp. e *Exophiala* spp (1).

Contudo, pouquíssimos estudos têm avaliado a suscetibilidade *in vitro* destes fungos frente a terbinafina isoladamente (1,2,4,20) e há apenas um registro na literatura sobre associação *in vitro* da terbinafina com outros antifúngicos em testes de suscetibilidade (12). De Hoog *et al* (2) relatam o uso de terbinafina (500mg) por 6 a 12 meses para casos de cromoblastomicoses com eficácia de 85%, mas, em geral, são poucos os estudos publicados sobre associação de antifúngicos frente a fungos demáceos.

No entanto, existem vários trabalhos publicados que relatam o sucesso terapêutico *in vivo* com o uso da terbinafina associada ou não com outros antifúngicos frente a espécies de fungos demáceos. Revankar (1) apresentou em seu trabalho bons resultados no tratamento de cromoblastomicose associando terbinafina com itraconazol. Kondo *et al.* (13), utilizaram a terbinafina no tratamento de um caso de cromomicose no Japão. De Hoog *et al.* (2) descreveram em seu artigo o tratamento de cromomicose com sucesso terapêutico em 85% dos casos utilizando terbinafina. Pang *et al.* (7) relatam o uso da associação de terbinafina com itraconazol em casos de eumicetomas e cromomicoses. Krishnan-Natesan *et al.* (21) citam em seu artigo que a combinação de terbinafina com azólicos e poliênicos é eficiente para o tratamento de feohifomicoses e cromomicoses. O artigo de Zhang *et al.* (22) relata bons

resultados no tratamento de dois casos de cromomicose recidivantes com a associação de terbinafina e itraconazol.

A associação de antifúngicos tem o objetivo de reduzir o aparecimento de isolados resistentes, diminuir a toxicidade relacionada às doses individuais e aumentar a eficácia em infecções mistas. Embora a avaliação de interações entre antifúngicos *in vitro* ainda necessite de mais detalhamento na padronização, é possível observar as reações de sinergismo (interação positiva), antagonismo (interação negativa) e indiferença (a combinação produz o mesmo resultado que o antifúngico mais ativo em separado) (19,23).

Para a realização da associação de antifúngicos *in vitro* é utilizada a técnica do tabuleiro de xadrez, publicada por Eliopoulos *et al* em 1991 (24). Através desta técnica é possível combinar as concentrações de dois antifúngicos diferentes em uma placa de microtitulação, de uma forma manual, prática e ainda proporciona uma clara leitura dos resultados (Figura 2). A terminação “tabuleiro de xadrez” é dada devido ao padrão formado nos poços da placa, pelas múltiplas diluições dos dois antifúngicos avaliados. Muitos autores publicaram atualizações desta técnica sendo a mais utilizada a de Ruiz-Cendoya *et al.* (19).

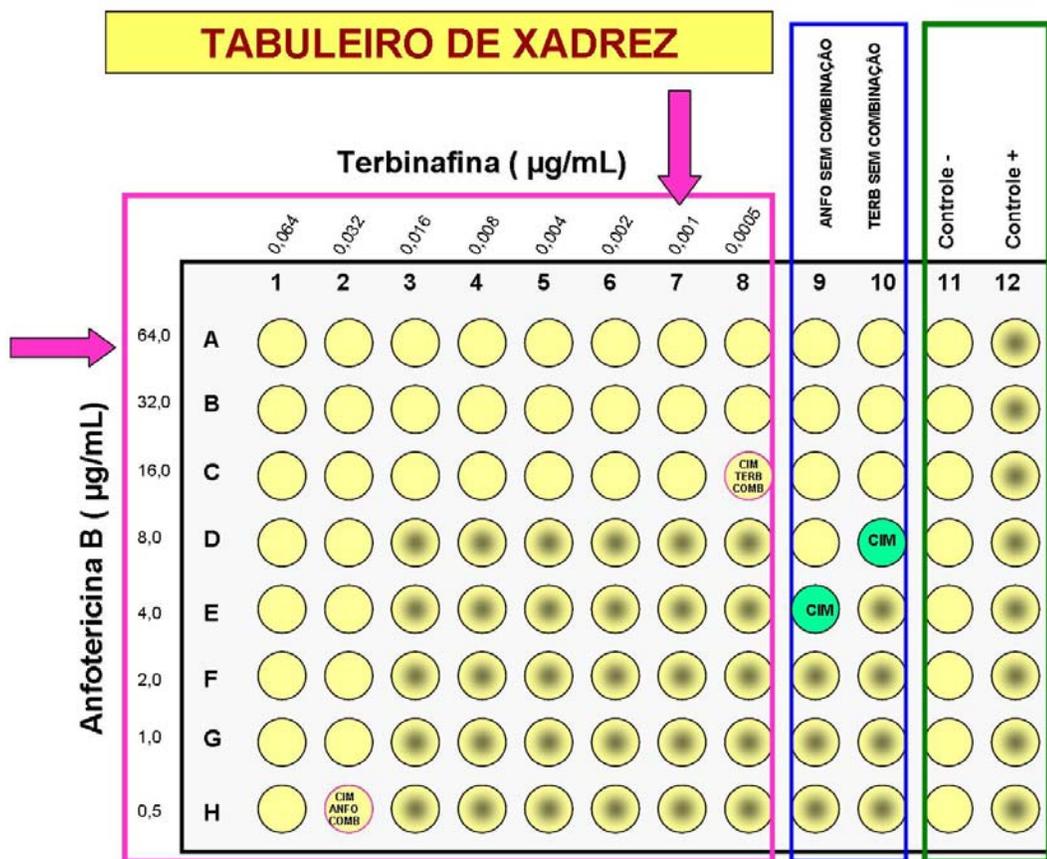


FIGURA 2: Exemplo da montagem da placa na metodologia de tabuleiro de xadrez, para a associação de antifúngicos.

Em adição, existem estudos *in vitro*, a maioria com a utilização da metodologia do tabuleiro de xadrez, que confirmam bons resultados da associação de terbinafina com outros antifúngicos, demonstrando baixos valores de CIM frente a uma grande variedade de fungos como *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Mucorales* spp., *Pythium insidiosum*, *S. prolificans*, *Paecilomyces* spp., dermatofitos e zigomicetos (12,14,25,26,27,28).

A terbinafina é uma alilamina sintética, utilizada por via tópica ou oral, e seu mecanismo de ação está baseado na inibição da enzima esqualeno-epoxidase que, por conseguinte, bloqueia a biossíntese do ergosterol, atuando independente do citocromo P-450. Além da deficiência do ergosterol, resulta também no acúmulo de esqualeno, que interfere nas funções da membrana e na síntese da parede celular (29).

Os derivados azólicos compreendem o itraconazol, cetozazol, fluconazol, miconazol, entre outros, que fazem parte de um grupo de agentes sintéticos, com estrutura química semelhante. Alguns podem ser administrados via tópica e oral. São fungistáticos e sua ação se dá pela inibição da biossíntese do ergosterol, através da inibição da ação da enzima 14 α -demetilase, com consequente alteração da permeabilidade da membrana e inibição de enzimas relacionadas ao metabolismo oxidativo, provocando o acúmulo de peróxidos, que é tóxico para o fungo (30).

Do ponto de vista do mecanismo de ação, a combinação de azólicos com terbinafina deveria demonstrar sinergismo, já que estes antifúngicos atuam em diferentes pontos da mesma via de formação do ergosterol (14).

O antifúngico anfotericina B tem como mecanismo de ação interagir com o ergosterol da membrana do fungo, provocando a formação de poros e consequente perda de material intracelular. Alguns autores afirmam que a combinação de terbinafina com anfotericina B seria antagônica, devido ao fato de, depois da ação da terbinafina, haver menos ergosterol na membrana, como alvo da anfotericina B (14,12).

1.4.2. Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos utilizando hifas

Ainda há muitas controvérsias em torno da avaliação de suscetibilidade a antifúngicos para fungos filamentosos. Devido às características morfológicas destes microrganismos, no ambiente e nos pacientes, há questionamentos sobre se a forma conidial, preconizada pela maioria das metodologias em uso, seria a mais adequada para esta avaliação (15,29). Os conídios são formas de resistência dos fungos filamentosos no ambiente, e as hifas são predominantes e, praticamente, a forma exclusiva em tecidos de indivíduos infectados (15,29).

A realização de testes de suscetibilidade utilizando hifas poderia mimetizar as características do fungo no tecido infectado, demonstrando melhor o potencial terapêutico do antifúngico (31).

Sendo assim, novos métodos que visam a utilização de hifas para avaliação da suscetibilidade dos antifúngicos frente a fungos filamentosos estão sendo avaliados, a procura de uma melhor correlação “*in vitro*” e “*in vivo*” (32). Em alguns estudos publicados sobre o assunto, utilizando diversas espécies de fungos filamentosos, a suscetibilidade de conídios e hifas foi similar (31,33). Em outros estudos, as hifas foram mais suscetíveis que os conídios (32,34,35) e, em oposição, em alguns estudos, os conídios foram mais suscetíveis (36,37). A discrepância nestes resultados poderia ser explicada pela variação no tipo de inóculo de hifa que foi utilizado por estes autores e a forma como foram feitas as análises dos resultados.

Levando em consideração que o crescimento nas hifas ocorre na região apical, a utilização de uma metodologia capaz de detectar automaticamente a extremidade das hifas e medir sua taxa de crescimento seria de grande interesse (35,38,39). O equipamento BioCell-Tracer (BCT) seria ideal para este tipo de estudo pois permite a análise de crescimento de hifas *in vitro* em tempo real, se tornando uma ferramenta alternativa para o estudo da atividade de drogas antifúngicas. Através do acompanhamento do crescimento *in vitro* de hifas a 35°C, que é a que mais se assemelha à temperatura corporal, é possível mimetizar uma situação de crescimento fúngico semelhante ao encontrado no organismo humano.

Este sistema tem potencial aplicação em pesquisas, pois quando um antifúngico é adicionado diretamente sobre as hifas, a curva de crescimento muda se o fungo for sensível ao agente, sendo possível a determinação da concentração inibitória mínima e também a determinação da ação fungistática ou fungicida do antifúngico avaliado (32,40).

O método permite a intensificação do acompanhamento do crescimento, em conjunto com registros e gráficos que são automaticamente gerados para melhor avaliação (35,39,40,41).

O sistema automatizado BioCell-Tracer (Figura 3) é constituído por uma base para as placas, um microscópio, uma câmara de vídeo, que capta a imagem das placas e as envia para um digitalizador de imagem, um microcomputador que monitora todo o desenvolvimento do experimento e um aparelho de vídeo. A imagem da hifa, formada na placa, é visualizada ao microscópio e filmada pela câmara que envia a imagem para o vídeo, onde é possível observar o crescimento da estrutura em detalhes. (35,39,41). O sistema possui ainda uma câmara de incubação onde a temperatura interna é ajustada de 10 a 50°C.



Figura 3: Fotografia do aparelho BioCell-Tracer. O equipamento é constituído de um microscópio com base para as placas, uma câmara de vídeo, um televisor com aparelho de vídeo, um digitalizador de imagens e um microcomputador. No detalhe da foto, a imagem da placa que irá ser analisada dentro da câmara do equipamento.

Com o auxílio do computador é possível escolher as melhores hifas a serem analisadas, bem como monitorar seu crescimento através do contraste de cor (Figura 4). Ao microscópio, as hifas adquirem coloração azul e a placa, com o meio de cultura, adquire coloração branca. O aparelho mede o deslocamento da coloração azul (hifa), sobre a coloração branca (placa).

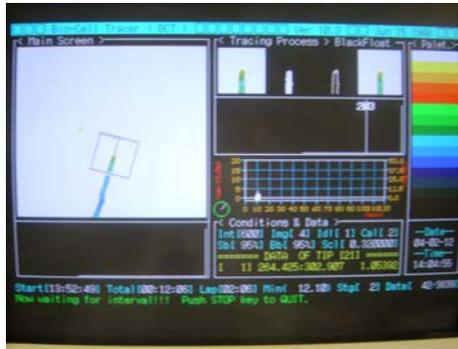


Figura 4: Imagem da tela do monitor do BioCell-Tracer. Na parte direita a imagem da hifa que está sendo analisada através do contraste de cor.

As informações obtidas geram gráficos, que podem ser analisados sozinhos ou em conjunto com outros gerados por análises posteriores (35,39,40). A figura 5 exemplifica o crescimento de uma única hifa:

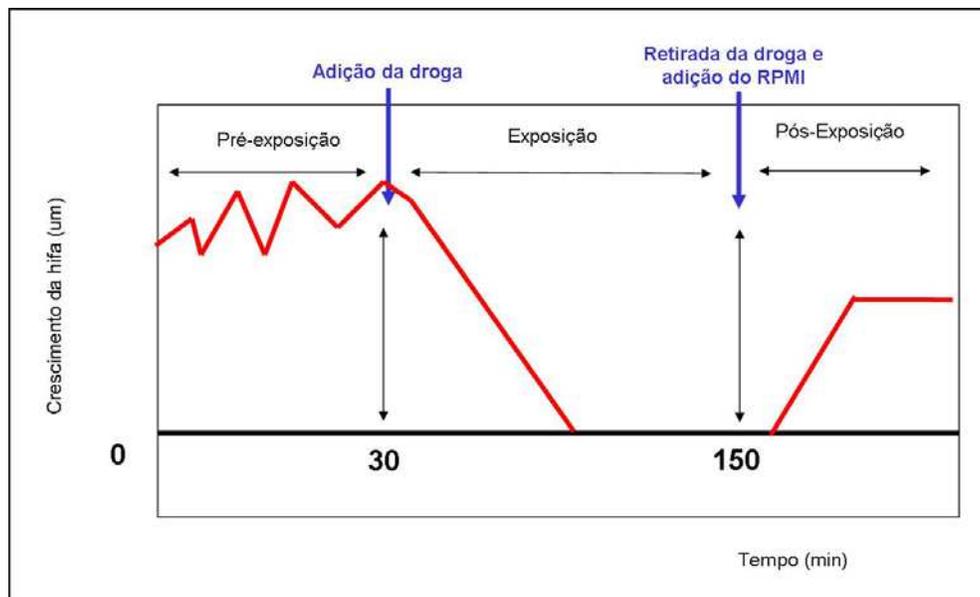


Figura 5: Representação esquemática da monitorização de crescimento da hifa: período pré-exposição: crescimento da hifa sem a adição da droga a ser testada. Período de exposição: exposição da hifa à droga em determinada concentração. Período de pós-exposição: crescimento da hifa após a retirada da droga a ser testada.

A vantagem de utilizar o sistema BCT está na análise em tempo real. Este sistema tem uma aplicação fundamental em pesquisa no que se refere à concomitante determinação da taxa de inibição de crescimento das hifas e determinação da atividade fungicida e fungistática. Uma

desvantagem, é que somente um isolado e uma concentração de substância podem ser avaliadas por vez (38,39).

São restritos os estudos publicados que utilizaram esta metodologia, visto que existem apenas cinco equipamentos no mundo. Ainda assim, foram avaliadas espécies de *Aspergillus* sp (15,38,39,40,41) *Fusarium* sp (15,35) e *Microsporum* sp (29). Não há registro na literatura de experimentos com o sistema BioCell-Tracer, utilizando hifas de fungos demáceos.

JUSTIFICATIVA

Devido ao crescente número de infecções causadas por fungos demáceos, e a dificuldade de se realizar um tratamento eficiente, se fazem necessários mais estudos sobre a suscetibilidade *in vitro* a antifúngicos para estes fungos.

Além da terapêutica clássica para tratamento das infecções fúngicas por fungos demáceos (itraconazol, voriconazol e anfotericina B), novos estudos têm demonstrado excelente eficácia *in vivo* da terbinafina associada ou não com outros antifúngicos. Porém, são poucos os relatos do uso da terbinafina *in vitro*. Mais escassos ainda são os estudos sobre a associação de terbinafina a outros antifúngicos em testes de suscetibilidade com fungos demáceos. Seria de grande interesse a realização destes testes com terbinafina pura e associada a outros antifúngicos, para embasamento da terapêutica mais apropriada.

Testes comparativos de suscetibilidade, entre inóculos de conídios e hifas, também seriam de grande interesse, principalmente se realizados para acompanhamento da terapêutica.

Com o uso da avaliação dinâmica de crescimento é possível calcular a taxa de inibição de crescimento das hifas, além de permitir a visualização em tempo real da ação do antifúngico sobre a hifa, o que nunca foi relatado para fungos demáceos.

Sendo assim, o propósito deste trabalho foi avaliar a suscetibilidade de conídios e hifas de alguns gêneros de fungos demáceos mais frequentemente isolados (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladophialophora*, *Curvularia*, *Exophiala* e *Fonsecaea*) frente aos antifúngicos itraconazol, voriconazol, anfotericina B isoladamente e em associação com terbinafina, utilizando a técnica de microdiluição em caldo e avaliação dinâmica de crescimento.

3. OBJETIVOS

- Avaliar a suscetibilidade dos isolados selecionados de fungos demáceos dos gêneros *Alternaria* sp, *Bipolaris* sp, *Cladophialophora* sp, *Curvularia* sp, *Exophiala* sp e *Fonsecaea* sp, frente aos antifúngicos: terbinafina, itraconazol, voriconazol, e anfotericina B, através da técnica de microdiluição em caldo.
- Avaliar a associação da terbinafina com itraconazol, voriconazol e anfotericina para os isolados selecionados de fungos demáceos dos gêneros *Alternaria* sp, *Bipolaris* sp, *Cladophialophora* sp, *Curvularia* sp, *Exophiala* sp e *Fonsecaea* sp, através da técnica de microdiluição em caldo com a utilização da metodologia do tabuleiro de xadrez.
- Avaliar a suscetibilidade dos seis isolados selecionados de fungos demáceos dos gêneros *Alternaria* sp, *Bipolaris* sp, *Cladophialophora* sp, *Curvularia* sp, *Exophiala* sp e *Fonsecaea* sp, frente aos antifúngicos: terbinafina, itraconazol, voriconazol, e anfotericina B, através da avaliação dinâmica de crescimento.
- Avaliar a associação da terbinafina com itraconazol, voriconazol e anfotericina para os seis isolados selecionados dos gêneros *Alternaria* sp, *Bipolaris* sp, *Cladophialophora* sp, *Curvularia* sp, *Exophiala* sp e *Fonsecaea* sp, através da avaliação dinâmica de crescimento.

4. CAPÍTULOS

Esta tese está baseada na informação CCPG-002/06 Unicamp que regulamenta o formato alternativo para tese de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou co-autoria do candidato.

Desta forma, esta tese é composta de dois artigos, os quais foram submetidos a revistas científicas internacionais, conforme descrito abaixo:

4.1. Artigo 1 - “Avaliação *in vitro* do tipo de interação obtida através da combinação de terbinafina com itraconazol, voriconazol ou anfotericina B frente a fungos demáceos. “

4.2. Artigo 2 – “Avaliação da suscetibilidade de terbinafina isoladamente em em combinação com anfotericina B, itraconazol e voriconazol frente a conídios e hifas de fungos demáceos.”

4.1. Artigo 1 - “Avaliação *in vitro* do tipo de interação obtida através da combinação de terbinafina com itraconazol, voriconazol ou anfotericina B frente a fungos demáceos. “

Fernanda Simas Corrêa Biancalana, Luzia Lyra and Angélica Zaninelli Schreiber.

School of Medical Sciences, University of Campinas, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Dr. Angélica Zaninelli Schreiber

State University of Campinas-UNICAMP

School of Medical Sciences - Department of Clinical Pathology

CEP 13083-887 Campinas, São Paulo, Brazil.

Phone: 55-19-32893273; Fax: 55-19-35219434

E-mail: zaninele@fcm.unicamp.br

Abstract

The increasing number of infections caused by dematiaceous fungi and the difficulty in establishing an efficient treatment suggest further study of *in vitro* antifungal susceptibility of these microorganisms. Studies have demonstrated excellent *in vivo* efficacy of terbinafine in combination with other antifungal agents; however, there is a lack of *in vitro* studies. The aim of this study was to investigate the type of *in vitro* interaction obtained by the combination of terbinafine versus itraconazole, voriconazole or amphotericin B against dematiaceous molds. Observing the drugs alone, voriconazole was the most active, followed by itraconazole, terbinafine and amphotericin B. In the associated test, the efficacy of each antifungal seemed to elevate, with lower MICs. The results indicated 100% of synergism in the interactions between

terbinafine and voriconazole, 96.5% of synergism between amphotericin B and terbinafine and 75.9% of synergism between terbinafine and itraconazole. No cases of antagonism were observed. Drug combinations may be a useful approach to treatments of infections caused by dematiaceous molds and an alternative to enhance the effectiveness of each drug and achieve efficacy using lower dosages.

Keywords: dematiaceous molds, antifungal susceptibility, combination of antifungal drugs.

Introduction

Dematiaceous fungi are responsible for a wide variety of infection syndromes that are typically distinguished based on histological findings into chromoblastomycosis, eumycetoma and phaeohyphomycosis (17). These black fungi are often found in soil and distributed worldwide and, in recent years, have been increasingly recognized as important pathogens especially in immunocompromised patients (13). There is little experience in the treatment of these infections. The selection of antifungal drugs, duration of therapy and therapeutic doses are not yet well established (11), depending always on the disease characteristics. Most reports consider azoles as the drug of choice for treatment (16,21,8,1,6), although terbinafine has been considered by some authors (13,16,1,22). We also found a few reports of *in vitro* studies of echinocandins with some activity against *Curvularia* sp, *Bipolaris* sp and *F. pedrosoi* (17,18). Some species were occasionally found to be resistant to *in vitro* amphotericin B, including *Curvularia* spp. and *Exophiala* spp. (17).

In some cases, especially in treatments without response to antifungal agents alone, drug combination could be an alternative approach to enhance the effectiveness of each drug and achieve efficacy using lower dosages (22). In addition, combination therapy could be used

in an attempt to prevent or delay emergence of resistant populations of pathogenic fungus *in vivo* (4).

There are reports of good results with the administration of terbinafine to patients in association with voriconazole and itraconazole (10,23). There are some *in vitro* studies, most using the checkerboard method, that confirms these findings with lower MIC's against a large variety of fungi, such as *Aspergillus* sp, *Candida* sp, *Mucorales* sp, *Pythium insidiosum*, *S. prolificans*, *Paecilomyces* sp, dermatophytes and zygomycetes (22,4,7,2,15,14). In general, there is a lack of studies about the effects of these associations on dematiaceous fungi.

Terbinafine inhibits ergosterol biosynthesis at the level of squalene epoxidation. From the mechanistic point of view, combination of azoles and terbinafine should exhibit synergy, since they are acting at different points of the same pathway (4). Conversely, amphotericin B interacts with the membrane ergosterol causing pores and consequently cellular material extravasations, what some authors affirm that leads to antagonism between terbinafine and amphotericin B because there will be less ergosterol in the cell membrane as target for amphotericin B (22,4). There are rare data of drug susceptibility of dematiaceous fungi (13,11,1,6,5,12,20) and rarer data on the use of combinations *in vitro* of antifungals agents for these fungi (22).

The aim of this study is to investigate the type of *in vitro* interaction obtained by the combination of terbinafine and itraconazole, voriconazol or amphotericin B against dematiaceous molds.

Materials and Methods

Isolates. Twenty-nine isolates of six genera of dematiaceous molds were evaluated: *Fonsecaea pedrosoi* (8), *Curvularia clavata* (1), *C.senegalensis* (1), *C.geniculata* (1) *C.lunata* (4), *Exophiala jeanselmei* (6), *Alternaria alternata* (5), *Cladophialophora bantiana* (1) and

Bipolaris sp (2). All of them were obtained from clinical specimens recovered during a period of eight years (2000-2008) at the University of Campinas Teaching Hospital-SP-Brazil. The isolates were stored in distilled water and transferred to potato dextrose agar (PDA) two weeks prior to enhancement of conidial production. All tubes were incubated at 35°C.

Antifungal agents. Terbinafine (TERB)(Novartis-Pharma AG, Basel, Switzerland), Itraconazole (ITZ)(Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), Amphotericin B (AMB) (Sigma St. Louis, MO, USA) and Voriconazole (VOR)(Vfend,Pfizer, NC, USA). AMB, ITZ and VOR were dissolved and diluted into sterile distilled water, and TERB was dissolved in DMSO (dimethyl sulfoxide) and diluted into sterile distilled water. Antifungal dilutions ranged from 128.0 to 0.25 µg/mL for ITZ and AMB, from 32.77 µg/mL to 0.064 µg/mL for TERB and 2.048 to 0.002 µg/mL for VOR.

Antifungal susceptibility testing. Individual MICs were determined following the microdilution method recommended by CLSI M38A2 with minor changes. The conidia forms were suspended by gently probing the colony with a sterile Pasteur pipette tip to dislodge the conidia from the hyphal mat and the solution and were counted in a Neubauer chamber and adjusted to a suspension containing 1×10^4 conidia/mL. The culture medium was RPMI 1640 (Sigma) with L-glutamine, without sodium bicarbonate, and buffered with 0.165 mol/L 3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) in pH 7.0. Microdilution plates were incubated at 35°C and read visually every day until the fifth day of incubation. The MIC was defined as the lowest drug concentration that caused 100% of inhibition of visible fungal growth. The tests were performed in duplicate. American Type Culture Collection strains were used for test quality control organisms: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6852, *Candida albicans* ATCC 76615 and *Candida albicans* ATCC 90028.

In vitro drug interaction. Drug interaction was evaluated in a checkerboard microdilution design (18,7,2) that easily provided a matrix of all positive drug combinations in the required concentration assayed. The dilutions ranged from 8.2 to 0.004 $\mu\text{g/mL}$ for TERB, 8.0 to 0.625 $\mu\text{g/mL}$ for ITZ, 32.0 to 0.25 $\mu\text{g/mL}$ for AMB and 2.048 to 0.008 $\mu\text{g/mL}$ for VOR. The interaction coefficient among drugs was quantitatively evaluated by means of the Fractional Inhibitory Concentration index (FIC), which was calculated by the following formula: $\text{FIC} = [\text{MIC A in combination}/\text{MIC A}] + [\text{MIC B in combination}/\text{MIC B}]$. The interaction was defined as synergistic if the FIC index was ≤ 0.5 , no interaction if $0.5 < \text{FIC} \leq 4.0$ and antagonistic if FIC was > 4.0 as used for most recent studies (18,7,2).

Results and Discussion

The MICs of isolated and combined drugs and the calculated fractional inhibitory concentration (FIC) index, as well as its interpretation, are shown in table 1. Observing the drugs alone (table 1), VOR was the most active with MICs, ranging between 0.064 and 2.048 $\mu\text{g/mL}$, followed by ITZ and TERB. AMB had the higher MICs alone, ranging between 0.5 and 32.0 $\mu\text{g/mL}$, with 96.5% of isolates showing resistance ($\geq 2.0 \mu\text{g/mL}$), confirming its low activity against dematiaceous molds (17,1,23,3). In the associated test, the efficacy of each antifungal seemed to elevate, with lower MICs. The results indicated 100% of synergism in the interactions between TERB and VOR, 96.5% of synergism between AMB and TERB and 75.9% of synergism between TERB and ITZ (table 1). No cases of antagonism were observed. Drug interaction was evaluated in a checkerboard microdilution design that easily provided a matrix of all positive drug combinations in the required concentration range. We already expected good results in the interaction between TERB and azoles. These drugs act at different points of the same pathway, inhibiting ergosterol biosynthesis, with TERB acting at the level of squalene epoxidation and the azoles at the level of 14α demethylase action.

Our findings agree with previous reports that show *in vitro* synergy between azoles and TERB for fungi, such as *Zygomycota*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladophialophora carrioni*, *Phialophora verrucosa*, *Scedosporium*, *Pythium* and *Aspergillus* species (22,7,2,14,19). MICs of AMB were drastically reduced by the addition of terbinafine. It can be a sign that a combination of oral TERB with parenteral AMB could be useful in the treatment of a case of invasive infections of dematiaceous molds.

Other authors also reported good interactions between TERB and AMB against *Zygomycota* (7). However, Yu *et al* reported indifference to this same combination against some dematiaceous fungi causing chromolastomycosis in China (22), as well as Guarro *et al* against *Paecilomyces* spp (15). Studies with *Aspergillus* spp showed antagonism for all isolates (4,10,9).

We speculated that a previous or concomitant treatment with azoles or TERB results in a fragile cell membrane due the action in ergosterol biosynthesis, what leads to an increase in permeability and efficacy of amphotericin B, and consequently lower MICs.

Drug combination may be a useful approach for treatment of infections caused by dematiaceous molds, as it has been demonstrated for other difficult-to-treat fungal infections like cryptococcal meningitis. It can be an alternative to enhance the effectiveness of each drug and achieve efficacy using lower dosages. The findings are very encouraging because the drugs tested showed synergistic or indifferent effects, with very low MICs, but never antagonistic interactions. Further studies are warranted to elucidate the clinical potential applications of these data.

Acknowledgements

We thank the Coordination for Higher Level Graduates Improvement (Capes) and the University of Campinas for supporting this study.

References

1. Andrade T.S., Castro L.G.M., Nunes R.S., Gimenes VM and A.E. Cury. 2004. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses*, 47, 216-221.
2. Argenta J.S., Santurio J.M., Alves S.H., Pereira D.I., Cavalheiro A.S., Spanamberg A. and L. Ferreira. 2008. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother*, 52: (2), 767-769.
3. Bedout, C., Gómez, B.L. and A. Restrepo. 1997. A. *In vitro* susceptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 39:(3).
4. Cuenca-Estrella M. 2004. Combinations of antifungal agents in therapy-what value are they? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 854-869.
5. Espinel-Ingroff A. 2001. *In vitro* fungicidal activities of Voriconazole, Itraconazole, and Amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol*, 39:(3),954-958.
6. Fothergill, A.W., Rinaldi, M.G. and D.A. Sutton. 2009. Antifungal susceptibility testing of *Exophiala* spp.: a head-to-head comparison of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *Med Mycol*, 47, 41-43.
7. Gómez-López A., Cuenca-Estrella M., Mellado E. and J.L.Rodríguez-Tudela. 2003. *In vitro* evaluation of combination of terbinafine with itraconazole or amphotericin B against *Zygomycota*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 45, 199-202.
8. Kantarcioglu A.S. and G.S. De Hoog. 2004. Infections of the central nervous system by melanized fungi: a review of the cases presented between 1999 and 2004. *Mycoses*, 47:4-13.
9. Kirkpatrick WR, Vallor AC, McAtee RK, Ryder NS, Fothergill AW, Rinaldi MG and T.F. Patterson. 2005. Combination therapy with terbinafine and amphotericin B in a rabbit model of experimental invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother*, 49: (11), 4751-4753.
10. Krishnan-Natesan S., Chandrasekar P.H., Manavathu E.K. and S.G. Revankar. 2008. Successful treatment of primary cutaneous *Aspergillus ustus* infection with surgical debridement and a combination of voriconazole and terbinafine. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62, 443-446.

11. Llop C., Sala J., Riba M.D. and J. Guarro. 1999. Antimicrobial susceptibility testing of dematiaceous filamentous fungi: Effect of medium composition at different temperatures and times of reading. *Mycopathologia*, 148: 25-31.
12. McGinnis, M.R. and L. Pasarel. 1998. *In vitro* testing of susceptibilities of filamentous ascomycetes to voriconazole, Itraconazole and Amphotericin B, with consideration of phylogenetic implications. *J Clin Microbiol*, 36:(8), 2353-2355.
13. Meletiadis J., Meis J.F., De Hoog S. and P.E. Verweij. 2000. *In vitro* susceptibilities of 11 clinical isolates of *Exophiala* species to six antifungal drugs. *Mycoses*, 43:309-312.
14. Meletiadis J., Mouton J.W., Meis J.F., and P.E. Verweij. 2003. *In vitro* drug interaction modeling of combinations of azoles with terbinafine against clinical *Scedosporium prolificans* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother*, 47 (1), 106-117.
15. Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Pujol I., Yustes S C., Serena C. and J. Guarro. 2004. *In vitro* interactions of approved and novel drugs against *Paecilomyces* spp. *Antimicrob. Agents Chemother*, 48:(7), 2727-2729.
16. Pang K.R., Wu J.J., Huang D.B. and S.K. Tying. 2004. Subcutaneous fungal infections. *Dermatol Terapy*, 17: 523-531.
17. Revankar, S.G. Dematiaceous fungi. 2007. *Mycoses*, 50: 91-101.
18. Ruíz-Cendoya M., Rodriguez M.M., Mariné M., Pastor F.J. and J. Guarro. 2008. *In vitro* interactions of itraconazole and micafungin against clinically important filamentous fungi. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, 418-420.
19. Ryder, N.S. and L. Leitner. 2001. Sinergistic interaction of terbinafine with triazoles or amphotericin B against *Aspergillus* species. *Med. Mycol*, 39:, 91-95.
20. Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendr C.A., Norris C.C., Hare R., Loebenberg D., Black T.A. and P.M. McNicholas. 2006. *In vitro* activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole and amphotericin B against molds and yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother*, 50:(6), 2009-2015.
21. Suh M.K. Phaeohyphomycosis in Korea. 2005. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 46, 67-70.
22. Yu J., Ruoyu L., Zhang M., Liu L. and Z. Wan. 2008. *In vitro* interactions of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblastomycosis in China. *Med Mycol*, 46, 745-747.
23. Zhang J., Xi L., Lu C., Li X., Xie T., Zhang H., Xie Z. and S. De Hoog. 2009. Successful treatment for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea monophora*: a report of three cases in Guangdong, China. *Mycoses*, 52, 176-181.

Table 1 – Minimal Inhibitory concentrations of terbinafine isolated and in combination with Itraconazole, Amphotericin B and Voriconazole and calculated Interactions for the 25 clinical isolates of dematiaceous molds included in the study

Species	Isolate Code	MIC single drug (µg/mL)		MIC combination (µg/mL)		Interaction		MIC single drug (µg/mL)		MIC combination (µg/mL)		Interaction		MIC single drug (µg/mL)		MIC combination (µg/mL)		Interaction	
		TB	AMB	TB	AMB	FIC	T	TB	ITZ	TB	ITZ	FIC	T	TB	VCZ	TB	VCZ	FIC	T
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	18	2.05	16.0	0.004	0.25	0.017	S	2.05	0.5	0.004	0.0625	0.127	S	2.05	0.064	0.004	0.001	0.018	S
	129	2.05	8.0	0.004	0.25	0.033	S	2.05	0.5	0.004	0.0625	0.127	S	2.05	0.128	0.004	0.008	0.0645	S
	2	0.256	16.0	0.00025	0.25	0.016	S	0.256	0.25	0.00025	0.0625	0.251	S	0.256	0.128	0.00025	0.004	0.033	S
	4	0.256	2.0	0.00025	0.25	0.126	S	0.256	0.25	0.00025	0.0625	0.251	S	0.256	0.128	0.00025	0.004	0.033	S
	731	4.10	32.0	0.004	0.125	0.005	S	4.10	0.25	0.004	0.0625	0.251	S	4.10	0.128	0.004	0.008	0.0635	S
	571	4.10	8.0	0.002	0.125	0.015	S	4.10	0.25	0.002	0.0625	0.2505	S	4.10	0.128	0.002	0.002	0.0165	S
	457	4.10	16.0	0.002	0.125	0.008	S	4.10	0.25	0.002	0.0625	0.2505	S	4.10	0.128	0.002	0.004	0.0315	S
	706	4.10	32.0	0.004	0.25	0.009	S	4.10	0.25	0.004	0.0625	0.251	S	4.10	0.128	0.004	0.004	0.034	S
<i>C. clavata</i>	359	2.05	0.5	0.008	0.032	0.068	S	2.05	0.25	0.008	0.0625	0.254	S	2.05	0.512	0.008	0.016	0.035	S
<i>C. senegalensis</i>	1004	4.10	2.0	0.008	0.0625	0.033	S	4.10	0.5	0.008	0.0625	0.127	S	4.10	0.256	0.008	0.016	0.0645	S
<i>C. lunata</i>	1005	2.05	8.0	0.008	0.032	0.008	S	2.05	0.25	0.008	0.0625	0.254	S	2.05	0.256	0.008	0.016	0.0665	S
<i>C. geniculata</i>	331	4.10	0.25	0.002	0.0625	0.25	S	4.10	0.125	0.004	0.0625	0.501	I	4.10	0.512	0.004	0.004	0.009	S
<i>C. lunata</i>	395	2.05	4.0	0.004	0.0625	0.017	S	2.05	8.0	2.05	0.25	1.03	I	2.05	2.048	0.004	0.016	0.01	S
<i>C. lunata</i>	1059	2.05	4.0	0.004	0.0625	0.017	S	2.05	0.25	0.004	0.125	0.002	S	2.05	0.256	0.004	0.016	0.0665	S
<i>C. lunata</i>	89	0.008	2.0	0.002	0.0625	0.281	S	0.008	0.25	0.002	0.0625	0.5	S	0.008	0.064	0.002	0.016	0.5	S
<i>Exophiala jeanselmei</i>	408	1.02	8.0	0.002	1.0	0.127	S	1.02	2.0	0.002	0.0625	0.033	S	1.02	0.128	0.002	0.004	0.033	S
	409	1.02	16.0	0.001	1.0	0.063	S	1.02	0.25	0.001	0.0625	0.251	S	1.02	0.128	0.001	0.008	0.0635	S
	410	1.02	8.0	0.002	1.0	0.127	S	1.02	0.25	0.001	0.0625	0.251	S	1.02	0.064	0.002	0.004	0.0645	S
	327	0.512	1.0	0.001	0.125	0.127	S	1.02	0.5	0.002	0.0625	0.127	S	1.02	0.128	0.001	0.008	0.0645	S
	801	1.02	2.0	0.001	0.25	0.126	S	1.02	8.0	1.02	0.0625	1.07	I	1.02	0.512	0.001	0.008	0.017	S
	531	1.02	16.0	0.002	0.5	0.033	S	1.02	0.25	0.002	0.0625	0.252	S	1.02	1.024	0.002	0.016	0.018	S
<i>Alternaria alternata</i>	314b	2.05	2.0	0.004	1.0	0.502	I	2.05	0.5	0.004	0.25	0.502	I	2.05	1.024	0.004	0.008	0.01	S
	260d	0.256	1.0	0.004	0.25	0.265	S	0.256	0.125	0.004	0.0625	0.515	I	0.256	0.256	0.004	0.032	0.14	S
	277c	2.05	4.0	0.002	0.25	0.063	S	2.05	0.125	0.002	0.25	2.0	I	2.05	0.512	0.002	0.128	0.25	S
	358b	4.10	4.0	0.002	0.25	0.063	S	4.10	1.0	0.002	0.0625	0.063	S	4.10	1.024	0.002	0.064	0.063	S
	100	0.016	4.0	0.002	0.0625	0.14	S	0.016	0.25	0.002	0.125	0.625	I	0.016	0.256	0.002	0.016	0.1875	S
<i>Bipolaris</i> sp	1015	1.02	4.0	0.008	0.0625	0.023	S	1.02	2.0	0.008	0.0625	0.039	S	1.02	0.064	0.008	0.008	0.133	S
	Bipl	1.02	4.0	0.008	0.0625	0.023	S	1.02	2.0	0.008	0.0625	0.039	S	1.02	0.256	0.008	0.016	0.0705	S
<i>C. bantiana</i>	B1	8.20	32.0	0.008	0.0625	0.003	S	8.20	0.25	0.008	0.0625	0.251	S	8.20	2.048	0.008	0.016	0.009	S

MIC: Minimal Inhibitory concentrations; TB: Terbinafine; ITZ: Itraconazole; AMB: Amphotericin B; VOR: Voriconazole; FIC: Fractional Inhibitory Concentration; T: Type of Interaction; S: Synergism; I: Indifference

4.2. Artigo 2 – “Avaliação da suscetibilidade de terbinafina isoladamente em em combinação com anfotericina B, itraconazol e voriconazol frente a conídios e hifas de fungos demáceos.”

Fernanda Simas Corrêa Biancalana, Luzia Lyra, Maria Luiza Moretti and Angélica Zaninelli Schreiber.

School of Medical Sciences, University of Campinas, São Paulo, Brazil

Address reprint requests to: Dr. Angélica Zaninelli Schreiber

Laboratório de Investigação em Fungos

Departamento de Patologia Clínica - Faculdade de Ciências Médicas

Universidade Estadual de Campinas – Unicamp

Cidade Universitária Zeferino Vaz, Cx. Postal 6142

CEP: 13083-970 Campinas – São Paulo, Brazil

Phone: 55-19-32893273; Fax: 55-19-35219434

E-mail: zaninele@fcm.unicamp.br

Keywords: dematiaceous molds, antifungal combination, hyphae susceptibility.

Synopsis

Dematiaceous molds occupy an important position among opportunistic fungi however, there has been far less progress in developing therapeutic methods, especially for the most severe clinical forms. Studies have demonstrated excellent *in vivo* efficacy of terbinafine in combination with other antifungal agents; however, there is a lack of *in vitro* studies. Most studies use inocula consisting exclusively of conidia, which are usually not the morphological form of the infective fungus manifested in patient. Susceptibility testing of a hyphal suspension could mimick the fungal status in infected tissues and might better reflect the therapeutic potential of the agent. Focusing on this situation, we investigated the *in vitro* susceptibility testing of terbinafine alone and in combination with amphotericin B, itraconazole or voriconazole against conidia and hyphae of dematiaceous molds. The minimal inhibitory concentration (MIC) values of isolates hyphal forms were lower than conidia, in some cases, two or three dilutions above the MIC of conidia. The results indicated 100% of synergism in interactions between terbinafine and azoles or amphotericin B using hyphae. In conclusion, our findings allow us to say that the hyphal form of dematiaceous molds has greater susceptibility to terbinafine, itraconazole, voriconazole and amphotericin B, alone and in combination with terbinafine, using the dynamic measurement system.

Introduction

Dematiaceous molds occupy an important position among opportunistic fungi, causing infections particularly in immunocompromised patients, sometimes involving the central nervous system.¹ Significant advances have been achieved over the last decade in our knowledge of the disease and its etiologic agents; however, there has been far less progress in developing therapeutic methods, especially for the most severe clinical forms.¹

Most reports consider azoles as the drug of choice for treatment,²⁻⁷ although terbinafine has been considered by some authors.^{3,6,8,9} In some cases, especially in treatments without response to antifungal agents alone, drug combination could be an alternative approach to enhance effectiveness of each drug and achieve efficacy using lower dosages.⁹

The predictive *in vivo* significance of *in vitro* antifungal susceptibility testing remains unclear. Most studies use inocula consisting exclusively of conidia, which are usually not the morphological form of the infective fungus manifested in patient.¹⁰ Susceptibility testing of a hyphal suspension mimicking the fungal status in infected tissues might better reflect the therapeutic potential of the agent.¹¹ Focusing on this situation, new methods for susceptibility testing of filamentous fungi using hyphae inoculum are being evaluated in the search for a better *in vitro* and *in vivo* correlation.¹² In some of them, the results of antifungal susceptibility for conidia and hyphae appeared similar.^{11,13} Other studies show higher susceptibility to hyphae,^{12,14,15} whereas others, to conidia.^{10,16} It can be explained by the variation of hyphal inoculum used and its antifungal susceptibility analysis.

Considering that the hyphal growth occurs in its apical region, we used a method that traces hyphal tip automatically and measures their growth rate. This system has potential application in fundamental research, MIC estimate, and also in the determination of fungicidal or fungistatic activities⁽¹²⁾. When adding an antifungal agent, the hyphal growth curve will be changed if the fungus is sensitive to the agent.¹⁷ Studies with *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Candida* spp.^{12,14,17-19} and dermatophytes (not yet published) have been carried out using this system.

There are only a few studies using hyphal inocula to evaluate antifungal combinations *in vitro*.¹⁸⁻²⁰ However, there is no report about *in vitro* antifungal combinations using conidia and hyphae of dematiaceous molds. Therefore, we investigated the *in vitro* susceptibility testing

of terbinafine alone and in combination with amphotericin B, itraconazole or voriconazole against conidia and hyphae of dematiaceous molds.

MATERIALS AND METHODS

This study was carried out in the Fungal Research Laboratory (LIF) and Molecular Epidemiology Laboratory at the Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, São Paulo, Brazil.

Samples: Six clinical isolates of six species of dematiaceous molds most isolated from phaeohyphomycosis in our hospital were analyzed (*Altenaria alternata*, *Bipolaris sp*, *Cladophialophora bantiana*, *Curvularia clavata*, *Exophiala jeanselmei* and *Fonsecaea pedrosoi*); they had been transferred to potato dextrose agar (PDA) two weeks before the experiment to stimulate conidial production. All tubes were incubated at 35°C.

Culture medium: RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) with L-glutamine, without sodium bicarbonate and buffered with 0.165 mol/L 3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS; Sigma chemical Co.) at pH 7.0 was used as the basal medium, either with or without antifungal agents.

Antifungal agents: Terbinafine (TRB)(Novartis-Pharma AG, Basel, Switzerland), itraconazole (ITZ)(Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), amphotericin B (AMB) (Sigma St. Louis, MO, USA) and voriconazole (VOR)(Pfizer, NC, USA). AMB, ITZ and VOR were dissolved and diluted into sterile distilled water, and TRB was dissolved in DMSO (dimethyl sulfoxide) and diluted into sterile distilled water. Antifungal dilutions ranged from 128.0 to 0.25 µg/mL for ITZ and AMB, from 32.77 µg/mL to 0.064 µg/mL for TRB and 2.048 to 0.002 µg/mL for VOR.

Determination of MIC and minimum fungicidal concentration (MFC) by broth microdilution using conidial forms: MICs for different antifungal agents obtained by broth microdilution testing with conidial forms, as described in CLSI M38-A2, 2008 (21), were used as the initial concentrations in the BCT system. In order to obtain the MFC after gentle homogenization, volumes of 10 μ l were taken from every well showing inhibition, spread onto PDA plates and incubated at 35 °C for 72 hrs or until growth of subcultures from the growth control well was apparent. The MFC of an antifungal agent was defined as the lowest drug concentration from which no colony was visible on the agar plate. Higher MFC than MIC determines fungistatic activity, the opposite, fungicidal activity.

In vitro drug interaction with conidial forms: drug interaction was evaluated using a checkerboard microdilution design (22, 23, 24) that easily provided a matrix of all positive drug combinations in the required concentration assayed. The dilutions ranged from 8.2 to 0.004 μ g/mL for TERB, 8.0 to 0.625 μ g/mL for ITZ, 32.0 to 0.25 μ g/mL for AMB and 2.048 to 0.008 μ g/mL for VOR. The interaction coefficient among drugs was quantitatively evaluated by means of the fractional inhibitory concentration index (FIC), which was calculated by the following formula: $FIC = [MIC\ A\ in\ combination/MIC\ A] + [MIC\ B\ in\ combination/MIC\ B]$. The interaction was defined as synergistic if the FIC index was ≤ 0.5 , no interaction if $0.5 < FIC \leq 4.0$ and antagonistic if FIC was > 4.0 , as used by the most recent studies.²²⁻²⁴

Dynamic measurement of hyphae growth: 10 μ L of the inoculum (10^6 conidia/mL) were dropped onto the center of plastic tissue culture dishes (Corning® CellBIND® Surface 35x10mm Culture Dish, NY, USA) previously impregnated with a 0.05% poly-L-lysine solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). The culture dishes were kept at room temperature for 50 minutes and then gently washed with 1 mL of sterile distilled water to remove the conidia that did not adhere to the poly-L-lysine. Two mL of RPMI were added and the plates were incubated for 72h-96h at 35°C. Suitable mature hyphae growing horizontally

adhered along the center of the dishes were then selected and their growth monitored with the Bio-Cell Tracer system (Hidan Co., Ltd, Kashiwa, Japan) every ten minutes.

Experimental design: The experiment was carried out over a three-and-a-half-hour period broken down as follows: 0-30 min – the pre-exposure period, when the control data for hyphal growth only in RPMI medium were collected; 30-150 min – the exposure period, when the response of hyphae to antifungal agents (alone or in combination) added to the RPMI medium after 30 minutes was observed; and 150-210 min – the post-exposure period, to measure hyphal regrowth after having been removed the antifungal agent and added the RPMI without antifungal agents after 150min, determining fungicidal/fungistatic activity. To evaluate the activity of each antifungal alone in the BCT system, we chose the MIC obtained by broth microdilution using conidial forms as the initial concentration, and for antifungal combination, we chose the MIC of combined antifungal agents obtained by checkerboard microdilution, using conidial forms. The last antifungal concentration used was the one that resulted in less than 50% growth inhibition, showing low antifungal activity. For each concentration of a particular drug, 10 to 25 hyphae were chosen to start the experiment. The difference between the length of each hypha at the beginning and end of each observation period was also calculated. Thus, for each isolate, a minimum of 10 hyphae were tested for each drug concentration.

Data evaluation: The growth data for dematiaceous mold isolates obtained during the control periods and the test using different concentrations of antifungal agents were plotted as dynamic response curves after having been calculated the median hyphal growth at 10-minute intervals. The median hyphal growth rate for each of the three periods considered was calculated and plotted as growth inhibition rate, using the SAS System for Windows statistical software.¹² The MIC of hyphae was defined as the lowest concentration that produced an abrupt fall in growth curve, resulting over 80% inhibition during the post-exposure period. The fungicidal/fungistatic

activity was determined during the post-exposure period: if fungus regrowth occurred in RPMI medium after removal of antifungal, we considered a fungistatic activity (growth Post exp > Exp), if not, a fungicidal activity (growth Exp > Post exp). The FIC was calculated with the same formula used for conidial forms in checkerboard method, but using only hyphae MIC, alone and in combination.

RESULTS

The MIC values for hyphal forms to all isolates were lower than conidia, in some cases, two or three dilutions above the MIC of conidia (table 1).

As shown in table 1, using antifungals alone, a significant reduction in growth inhibition rate of hyphal forms was observed even after the second or third serial two-fold dilution below the MIC obtained for conidia.

The growth inhibition rates for voriconazole and amphotericin B evaluated alone, during the post-exposure period, were higher than those obtained during the exposure period, suggesting a fungicidal action for all isolates tested. In contrast, the opposite was observed for terbinafine and itraconazole, which suggests a fungistatic action against the isolates evaluated (table 2).

The MIC values for conidial forms to all isolates, with antifungal combinations were lower than those obtained for conidia using antifungal alone. And the values obtained to hyphae using antifungal combinations was even lower, being in some cases, two or three dilutions above the MIC of conidia (tables 3 and 4). The results indicated 100% of synergism in the interactions between terbinafine and azoles or amphotericin B using hyphae (table 4).

DISCUSSION

Antifungal combination could be an alternative approach to enhance the effectiveness of each drug and achieve efficacy using lower dosages, especially in treatments without response to antifungal agents alone.⁹ Most *in vitro* antifungal combination studies use conidia in the checkerboard method. Conversely, susceptibility testing using hyphae mimicking the fungal status in infected tissues might better reflect the therapeutic potential of the agent.¹¹

There have been only a few studies on *in vitro* susceptibility testing involving the use of fungal hyphae,^{10,11,13,20,25} and even fewer tests using antifungal susceptibility combination and none of them evaluated dematiaceous molds.¹⁸⁻²⁰ These studies have provided variable results. This can be explained by the use of different hyphal inoculum and methodology. Pujol *et al*¹⁰ used an inoculum of filtered hyphal fragments by a broth microdilution, Tracy *et al*¹³ used hyphae obtained by incubated conidia with the rapid susceptibility assay (hRSA), which analyzed residual glucose levels, and some studies used the XTT assay to measure inhibition of fungal metabolic activity based on the use of tetrazolium salts as an indicator.^{11,16,20,25} Oh *et al*¹⁸ and Taguchi *et al*¹⁹ used BCT system to evaluate the effect of association between amphotericin B and flucytosine on hyphal growth in *Candida albicans* and between amphotericin B and 5-fluorocytosine on hyphal inhibition in *Aspergillus fumigatus*. Perkhofer *et al*²⁰ used the XTT assay to evaluate the association between voriconazole and anidulafungin for *Aspergillus* spp. hyphae.

Considering the fact that the hyphal growth occurs in its apical region, we presented in this study the *in vitro* susceptibility of hyphae using BCT system, which traces hyphal tip automatically and measures their growth rate, providing information about the action of antifungal agents applied directly to hyphae in real time.

The initial concentration of antifungal agents used in BCT system corresponded to the MIC obtained for conidial forms of each drug, determined in the broth microdilution test.

Decreasing concentrations were then evaluated until the growth inhibition rate obtained during the exposure period was less than or equal to 50%, a concentration with low antifungal activity.

Evaluation of antifungals alone

Our results show a higher susceptibility to hyphal forms of dematiaceous molds. The MIC obtained for hyphae was lower than that obtained for conidia, using antifungal association. For all antifungal agents tested, a significant reduction in growth inhibition rate was observed after the second or third serial two-fold dilution below the MIC obtained for conidia (table 1) during both the exposure and post-exposure periods. A fourth serial two-fold dilution below the MIC was only required for voriconazole against *C. bantiana* and *C. clavata* isolates.

Voriconazole and itraconazole was the most active drug against conidia and hyphae, in agreement with previous studies with dematiaceous fungi.^{7,26,27} *C. bantiana* and *F. pedrosoi* showed resistance to amphotericin B, with MIC of 32.0 µg/mL against conidia and 16.0 µg/mL against hyphae (table 2).

Teixeira *et al*^{12,15}, investigating *Fusarium* sp and *Aspergillus* sp isolates with the BCT system, obtained similar results, with lower MIC for hyphal forms when comparing with conidial forms. Guarro *et al*¹⁴ found higher MIC of terbinafine, itraconazole and voriconazole for conidia than hyphae of dermatophytes, using a suspension of hyphal fragments.

Two studies reported similar MIC of *A. fumigatus* conidia and hyphae for amphotericin B, itraconazole and voriconazole using XTT assay and hRSA assay, respectively.^{11,13} However, Pujol *et al*¹⁰ found higher MIC of itraconazole and voriconazole for conidia than hyphae of *C. bantiana* and other filamentous fungi, using a suspension of hyphal fragments.

The growth inhibition rates against voriconazole and amphotericin B during the post-exposure period were higher than in the exposure period, suggesting a fungicidal action for all isolates tested. In contrast, the opposite was observed against terbinafine and itraconazole, which suggested a fungistatic action against the isolates evaluated (tables 1-2). Comparing

these results with the MFC values, obtained for conidial forms, they were similar, with the same results for the antifungal agents evaluated.

Evaluation of antifungal combinations

Our results indicated synergism in all interactions for conidia and hyphae evaluated. The MIC of combined antifungal agents was very lower than to antifungal agents used alone and even lower when we used hyphae.

We already expected good results in the interaction between terbinafine and azoles. These drugs act at different points of the same pathway, inhibiting ergosterol biosynthesis, with terbinafine acting at the level of squalene epoxidation and azoles at the level of 14- α -demethylase action, in agreement with other authors.^{9,23,24}

Oh *et al*¹⁸ found the same results using BCT system to evaluate the effect of association between amphotericin B and flucytosine on hyphal growth of *Candida albicans*. Taguchi *et al*¹⁹, also using BCT system, showed synergistic effects of amphotericin B and 5-fluorocytosine on the growth rate of *Aspergillus fumigatus*.

Conversely, amphotericin B interacts with the membrane ergosterol, causing pores and consequent cell material extravasations, which leads to antagonism between terbinafine and amphotericin B, according to some authors, since there will be less ergosterol in the cell membrane as target for amphotericin B^{9,28}, which did not occur in our study, with 100% of synergism for all isolates evaluated .

Perkhofer *et al*,²⁰ using the XTT assay to measure inhibition of fungal metabolic activity based on using tetrazolium salts as an indicator, found indifference between voriconazole and anidulafungin for *Aspergillus* spp. hyphae.

Measurement of the inhibition of hyphal growth could be a suitable method for evaluating antifungal susceptibility, particularly of fungal pathogens that produce a small number of spores, and for mimicking the fungal status in infected tissues to better reflect the

therapeutic potential of the agent. There are different methods used to make this analysis with variable results. In conclusion, our findings allow us to say that the hyphal form of dematiaceous molds has greater susceptibility to terbinafine, itraconazole, voriconazole and amphotericin B, alone and in combination with terbinafine, using BCT system.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Coordination for Higher Level Graduates Improvement (Capes) and the University of Campinas for supporting this study.

FUNDING

This work was supported by University of Campinas and Coordination for Higher Level Graduates Improvement

TRANSPARENCY DECLARATIONS

1. Have you in the period of research leading up to this publication accepted any of the following from an organization (including government departments or granting bodies) that may in any way be financially affected by the conclusions of your article (e.g. reimbursement for attending a symposium, a fee for speaking, a consultancy fee, funds for research other than directly for this work, funds for a member of staff, any other substantial material benefit)? **NO.**
2. Do you directly own any stocks or shares in a company that might be financially affected by the conclusions of your article? **NO.**
3. Has the funder of the research played any decision-making role in the design, execution, analysis or reporting of the research? **NO.**
4. Have you received the assistance of a professional medical writer or similar service? [The precise role of the writer or service in the origin or preparation of the manuscript must be declared and we recommend that the name of the writer (and their agency where applicable) or

the service is provided.] **NO.**

5. Have you accepted any reimbursement for preparing your article? **NO.**

REFERENCES

1. Llop C, Sala J, Riba MD *et al.* Antimicrobial susceptibility testing of dematiaceous filamentous fungi: Effect of medium composition at different temperatures and times of reading. *Mycopathologia* 1999; **148**: 25-31.
2. Silveira F, Nucci M. Emergence of black molds in fungal disease: epidemiology and therapy. *Curr Opin Infect Dis* 2001; **14**: 679-684.
3. Pang KR, Wu JJ, Huang DB, *et al.* Subcutaneous fungal infections. *Dermatol Terapy* 2004; **17**: 523-531.
4. Suh MK. Phaeohyphomycosis in Korea. *Jpn. J. Med. Mycol* 2005; **46**: 67-70.
5. Kantarcioglu AS, DeHoog GS Infections of the central nervous system by melanized fungi: a review of the cases presented between 1999 and 2004. *Mycoses* 2004; **47**:4-13.
6. Andrade TS, Castro LGM, Nunes RS, *et al.* Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses* 2004; **47**: 216-221.
7. Fothergill AW, Rinaldi MG, Sutton DA. Antifungal susceptibility testing of *Exophiala* spp.: a head-to-head comparison of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *Med Mycol* 2009; **47**: 41-43.
8. Meletiadis J, Meis JFGM, DeHoog S. *In vitro* studies of 11 clinical isolates of *Exophiala* species to six antifungal drugs. *Mycoses* 2000; **43**:309-312.
9. Yu J, Ruoyu L, Zhang M, *et al.* *In vitro* interactions of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblastomycosis in China. *Med Mycol* 2008; **46**: 745-747.
10. Guarro J, Llop C, Aguilar C *et al.* Comparison of in vitro antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41(12)**: 2760-2762.
11. Van de Sande WWJ, Tavakol M. Vianen WV *et al.* The effects of antifungal agents to conidial and hyphal forms of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 2010; **48**: 48-55.
12. Teixeira ABA, Moretti ML, Machado HC *et al.* Evaluation of the inhibitory effect of amphotericin B on the apical growth of *F.solani* using the BioCell-Tracer[®] System. *Mycoses* 2007; **50**: 183-188.
13. Wetter TJ, Hazen KC, Cutler JE. Comparison between *Aspergillus fumigatus* conidia and hyphae susceptibilities to amphotericin B, itraconazole and voriconazole by use of the mold rapid susceptibility assay. *Med Mycol* 2005; **43**: 525-532.
14. Fernandez-Torres B, Inza I, Guarro J. Comparison of in vitro antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of dermatophytes with thick-wall macroconidia. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **43(10)**: 3371-3372.

15. Teixeira ABA, Moretti ML, Trabasso P *et al.* Evaluation of *Fusarium solani* hyphae and conidia susceptibility to amphotericin B and itraconazole: study of a clinical case. *Mycopathologia* 2005; **116(4)**:291-296.
16. Spreghini E, Orlando F, Giannini D *et al.* In vitro and in vivo activities of posaconazole against zygomycetes with various degrees of susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65(10)**:2158-63.
17. Ansheng L, Taguchi H, Miyaji M *et al.* Study on the hyphal responses of *Aspergillus fumigatus* to the antifungal agent by Biocell-Tracer. *Mycopathologia* 1999; **148**: 17-23
18. Oh K, Yang HC, Matsuoka A *et al.* Combined effect of amphotericin B and flucytosine on hypha growth of *Candida albicans* estimated at a single hypha level. *J Med Vet Mycol* 1995; **33(3)**: 01-04.
19. Taguchi H, Miyaji M, Nishimura K *et al.* Studies on the synergistic effect of amphotericin B and 5-fluorocytosine on the growth rate of single hyphae of *Aspergillus fumigatus* by a biocell-tracer system. *Mycoscience* 1995; **36**: 341-344.
20. Perkhofer S, Jost D, Dierich MP *et al.* Susceptibility testing of anidulafungin and voriconazole alone and in combination against conidia and hyphae of *Aspergillus* spp. under hypoxic conditions. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52(5)**: 1873-1875.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Approved standard M38-A2*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2005.
22. Ruíz-Cendoya M, Rodríguez MM, Mariné M, *et al.* In vitro interactions of itraconazole and micafungin against clinically important filamentous fungi. *Int J of Antimicrob Agents* 2008; **32**: 418-420.
23. Gómez-López A, Cuenca-Estrella M, Mellado E, *et al.* In vitro evaluation of combination of terbinafine with itraconazole or amphotericin B against *Zygomycota*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; **45**, 199-202.
24. Argenta JS, Santurio JM, Alves SH *et al.* In vitro activities of voriconazole, itraconazole and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother* 2008; **52(2)**:767-769.
25. Perkhofer S, Locher M, Cuenca-Estrella M *et al.* Posaconazole enhances the activity of Amphotericin B against hyphae of zygomycetes in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother* 2008; **52(7)**: 2636-2638.
26. Revankar SG. Dematiaceous fungi. *Mycoses* 2007; **50**: 91-101.
27. Espinel-Ingroff A. In vitro fungicidal activities of Voriconazole, Itraconazole, and Amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol* 2001, **39(3)**:954-958.

Table 1: Growth inhibition rate (GIR) of decreasing concentrations of voriconazole, itraconazole, amphotericin B and terbinafine alone for dematiaceous molds during the exposure and post-exposure periods

Isolates	Period	Antifungal agents																	
		Voriconazole				Itraconazole				Amphotericin B				Terbinafine					
		MIC	Dilutions below MIC value			MIC	Dilutions below MIC value			MIC	Dilutions below MIC value			MIC	Dilutions below MIC value				
			1	2	3	4		1	2	3		1	2	3		1	2	3	
<i>Alternaria alternata</i>	GIR	Exp	100%	93.0%	65.0%	42.1%	100%	96.7%	60.8%	28.3%	100%	100%	63.3%	42.3%	100%	92.3%	62.8%	41.8%	
		Post exp	100%	97.4%	71.6%	52.4%	96.6%	92.8%	35.5%	13.6%	100%	100%	82.6%	49.8%	97.9%	88.5%	49.8%	20.0%	
<i>Bipolaris sp</i>	GIR	Exp	100%	99.0%	92.7%	49.3%	100%	94.6%	69.9%	49.2%	100%	97.9%	84.5%	49.8%	100%	91.3%	89.0%	49.3%	
		Post exp	100%	100%	98.1%	34.0%	92.5%	87.9%	63.1%	37.7%	100%	100%	90.4%	57.9%	91.3%	88.4%	84.0%	42.8%	
<i>Cladophialophora bantiana</i>	GIR	Exp	100%	97.7%	86.8%	54.7%	44.1%	100%	100%	58.5%	33.7%	100%	94.2%	66.6%	22.6%	100%	99.7%	60.1%	49.7%
		Post exp	100%	98.9%	93.4%	60.7%	49.6%	98.7%	91.3%	56.4%	32.8%	100%	98.5%	72.1%	29.5%	99.3%	96.2%	48.7%	48.1%
<i>Curvularia clavata</i>	GIR	Exp	100%	99.2%	96.9%	70.9%	43.6%	100%	97.1%	58.8%	46.9%	100%	90.0%	86.2%	29.7%	100%	94.2%	75.4%	44.6%
		Post exp	100%	100%	99.9%	91%	45.3%	94.0%	90.3%	54.1%	37.1%	100%	100%	88.6%	40.1%	93.3%	87.7%	65.9%	35.3%
<i>Exophiala jeanselmei</i>	GIR	Exp	100%	90.7%	83.8%	41.1%	100%	97.7%	52.8%	31.3%	100%	84.9%	56.1%	44.7%	100%	93.5%	56.7%	39.4%	
		Post exp	100%	100%	87.7%	27.4%	100%	88.1%	47.6%	20.0%	100%	94.2%	74.7%	34.5%	96.5%	92.4%	28.8%	32.7%	
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	GIR	Exp	100%	99.7%	59%	43.3%	100%	99.3%	71.7%	42.0%	100%	98.3%	71%	41.8%	100%	100%	88.2%	48.5%	
		Post exp	100%	100%	47.1%	18.4%	98.5%	93.0%	60.8%	30.1%	100%	100%	76.3%	48%	98.0%	95.8%	82.9%	41.1%	

GIR: growth inhibition rate; Exp: antifungal exposure period; Post-exp: antifungal post-exposure period.

Table 2: MIC and MIF values obtained for conidia using broth microdilution and MIC values and growth inhibition rates obtained during the antifungal post-exposure period for hyphae

<i>Isolates</i>	Antifungal agents															
	voriconazole				itraconazole				amphotericin B				terbinafine			
	conidia		hyphae		conidia		Hyphae		conidia		hyphae		conidia		hyphae	
MIC	MIF	MIC	Antifungal activity	MIC	MIF	MIC	Antifungal activity	MIC	MIF	MIC	Antifungal activity	MIC	MIF	MIC	Antifungal activity	
<i>Alternaria alternata</i>	1.024	1.024	0.512	Post exp>Exp	1.0	2.0	0.5	Exp > Post exp	4.0	4.0	1.0	Post exp>Exp	4.10	8.20	2.05	Exp > Post exp
<i>Bipolaris sp</i>	0.256	0.256	0.064	Post exp>Exp	2.0	4.0	1.0	Exp > Post exp	4.0	4.0	1.0	Post exp>Exp	1.02	2.04	0.256	Exp > Post exp
<i>Cladophialophora bantiana</i>	2.048	2.048	0.512	Post exp>Exp	0.25	0.5	0.125	Exp > Post exp	32.0	32.0	16.0	Post exp>Exp	8.20	16.4	4.1	Exp > Post exp
<i>Curvularia clavata</i>	0.512	0.512	0.064	Post exp>Exp	0.25	0.5	0.125	Exp > Post exp	0.5	0.5	0.125	Post exp>Exp	2.05	4.1	1.02	Exp > Post exp
<i>Exophiala jeanselmei</i>	0.128	0.128	0.032	Post exp>Exp	0.5	1.0	0.25	Exp > Post exp	1.0	1.0	0.5	Post exp>Exp	0.512	1.02	0.256	Exp > Post exp
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	0.128	0.128	0.064	Post exp>Exp	0.25	0.5	0.125	Exp > Post exp	32.0	32.0	16.0	Post exp>Exp	4.10	8.20	1.02	Exp > Post exp

Legend: Higher MFC than MIC determines fungistatic activity, the opposite, fungicidal activity.

Table 3: Growth inhibition rate of dematiaceos molds in the exposure and post-exposure to antifungals period, being the first concentration evaluated the MIC of combined drugs obtained in the checkerboard technique.

<i>Isolates</i>		<i>Antifungal agents in combination</i>																																							
		<i>amphotericin B + terbinafine</i>								<i>itraconazole + terbinafine</i>								<i>voriconazole + terbinafine</i>																							
		AMB	TRB	AMB	TRB	AMB	TRB	AMB	TRB	ITZ	TRB	ITZ	TRB	ITZ	TRB	ITZ	TRB	VOR	TRB	VOR	TRB	VOR	TRB	VOR	TRB																
<i>A. alternata</i>	Concentrations	0.25+0.002	0.125+0.001	0.0625+0.005	0.03+0.0025	0.0625+0.002	0.03+0.001	0.015+0.0005	-	0.064+0.004	0.032+0.002	0.016+0.001	0.008+0.0005	GIR	Exp	99.6%	95.2%	86.4%	52.7%	100%	96.9%	39.6%	-	100%	98.5%	90%	48.9%	Post-exp	100%	97.3%	93.1%	42.8%	97.8%	94.1%	28.3%	-	100%	99.9%	93.7%	53.2%	
	<i>Bipolaris olarsii</i> sp	Concentrations	0.0625+0.008	0.03+0.004	0.015+0.002	0.007+0.001	0.0625+0.008	0.03+0.004	0.015+0.002	0.007+0.001	0.016+0.008	0.008+0.004	0.004+0.002		0.002+0.001	Exp	99.5%	97.4%	89%	55%	100%	94.7%	85.9%	45.5%	96.6%	92%	92.5%	42%	Post-exp	100%	100%	98.7%	40.2%	92.5%	90.8%	87.7%	37.6%	100%	100%	94.5%	46.8%
	<i>C. bantiana</i>	Concentrations	0.0625+0.008	0.031+0.004	0.015+0.002	0.007+0.001	0.0625+0.008	0.031+0.004	0.015+0.002	0.007+0.001	0.016+0.008	0.008+0.004	0.004+0.002		0.002+0.001	Exp	100%	94.5%	89.9%	35%	100%	100%	95.4%	45.6%	100%	98.4%	96.4%	41%	Post-exp	100%	97.5%	92.6%	40.1%	99.3%	92.3%	88.8%	21.1%	100%	100%	99.1%	51%
<i>C. clavata</i>	Concentrations	0.032+0.008	0.016+0.004	0.008+0.002	0.004+0.001	0.0625+0.008	0.03+0.004	0.015+0.002	-	0.016+0.008	0.008+0.004	0.004+0.002	0.002+0.001	GIR	Exp	99.4%	98.2%	92.3%	41.53%	100%	96.9%	49.4%	-	99.5%	99.3%	96.1%	47.8%	Post-exp	100%	100%	99.8%	49.8%	93.7%	88.4%	36.7%	-	100%	100%	98.4%	57.7%	
<i>E. jeanselmei</i>	Concentrations	0.125+0.001	0.0625+0.0005	0.03+0.00025	0.015+0.00012	0.0625+0.002	0.03+0.001	0.015+0.0005	-	0.008+0.001	0.004+0.0005	0.002+0.00025	0.001+0.000125		Exp	99.6%	93.7%	80.1%	47%	100%	97.6%	56.7%	-	96.4%	97.2%	91.4%	46.4%	Post-exp	100%	96.5%	84.9%	54.3%	99.3%	91.3%	45.1%	-	100%	98.9%	96.3%	31.2%	
<i>F. pedrosoi</i>	Concentrations	0.25+0.004	0.125+0.002	0.0625+0.001	0.03+0.0005	0.0625+0.004	0.003+0.002	0.0015+0.001	0.007+0.0005	0.004+0.004	0.002+0.002	0.001+0.001	0.0005+0.0005		Exp	100%	96.7%	90.4%	47.4%	100%	94.9%	90.2%	48.5%	100%	96.4%	90.8%	51.3%	Post-exp	100%	99.7%	93.5%	51.4%	92.1%	92.2%	87.5%	32.9%	100%	100%	96.7%	42.8%	

GIR: Growth inhibition rate; Exp: exposure period; Pexp: post-exposure period.

Table 4: Interaction of conidia and hyphal forms of dematiaceous molds to a combination of antifungal agents.

Isolates	MIC of conidia for combined antifungal agents ($\mu\text{g/mL}$)												MIC of hyphae for combined antifungal agents ($\mu\text{g/mL}$)											
	AMB + TRB				ITZ + TRB				VOR + TRB				AMB + TRB				ITZ + TRB				VOR + TRB			
	AMB	TRB	FIC	INT	ITZ	TRB	FIC	INT	VOR	TRB	FIC	INT	AMB	TRB	FIC	INT	ITZ	TRB	FIC	INT	VOR	TRB	FIC	INT
<i>A.alternata</i>	0.25	0.002	0.063	S	0.0625	0.002	0.063	S	0.064	0.004	0.063	S	0.0625	0.005	0.065	S	0.03	0.001	0.06	S	0.016	0.001	0.036	S
<i>Bipolaris</i> sp	0.0625	0.008	0.023	S	0.0625	0.008	0.039	S	0.016	0.008	0.07	S	0.015	0.002	0.093	S	0.015	0.002	0.093	S	0.004	0.002	0.07	S
<i>C.bantiana</i>	0.0625	0.008	0.003	S	0.0625	0.008	0.251	S	0.016	0.008	0.009	S	0.015	0.002	0.001	S	0.015	0.002	0.12	S	0.004	0.002	0.008	S
<i>C.clavata</i>	0.032	0.008	0.068	S	0.0625	0.008	0.254	S	0.016	0.008	0.035	S	0.008	0.002	0.066	S	0.03	0.004	0.24	S	0.004	0.002	0.06	S
<i>E.</i> <i>jeanselmei</i>	0.125	0.001	0.127	S	0.0625	0.002	0.127	S	0.008	0.001	0.064	S	0.03	0.00025	0.07	S	0.03	0.001	0.124	S	0.002	0.00025	0.063	S
<i>F.pedrosoi</i>	0.25	0.004	0.009	S	0.0625	0.004	0.251	S	0.004	0.004	0.034	S	0.0625	0.001	0.005	S	0.0015	0.001	0.013	S	0.001	0.001	0.016	S

FIC: fractional inhibitory concentration; Int.: interactions; S: synergism.

5. DISCUSSÃO GERAL

5.1. Avaliação da suscetibilidade dos conídios dos isolados selecionados de fungos demáceos dos gêneros *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladophialophora*, *Curvularia*, *Exophiala* e *Fonsecaea*, frente aos antifúngicos não combinados: terbinafina, itraconazol, voriconazol, e anfotericina B, através da técnica de microdiluição em caldo.

Os valores de CIM para os antifúngicos não combinados demonstraram que o voriconazol foi o antifúngico mais ativo, com valores variando entre 0,064 e 2,048 µg/mL, seguido de itraconazol e terbinafina (artigo 1, Tabela 1). Anfotericina B demonstrou altos valores de CIM variando entre 0,5 e 32,0 µg/mL, com 96,5% dos isolados, confirmando a baixa atividade deste antifúngico em fungos demáceos (1).

Andrade *et al.* (10) e Bedout *et al.* (42), também obtiveram altos valores de CIM para anfotericina B e fluconazol e, baixos valores para terbinafina frente a isolados de *Fonsecaea pedrosoi*. Zhang *et al.* (22), em seu estudo, demonstraram resistência à anfotericina (CIM >32,0 µg/mL) e baixos valores de CIM para terbinafina e itraconazol frente a quatro isolados de *Fonsecaea monophora*. Fothergil *et al.* (11) relataram em seu estudo, com isolados de *Exophiala* sp, que os antifúngicos mais ativos, *in vitro*, foram o itraconazol e posaconazol, e o menos ativo foi a anfotericina B. Em contrapartida, Meletiadis *et al.* (4) também avaliando a suscetibilidade a antifúngicos de isolados de *Exophiala* sp, determinaram que a terbinafina foi o antifúngico mais ativo *in vitro*, seguida de voriconazol, itraconazol e anfotericina B.

Sabatelli *et al.* (43), em seu estudo com isolados de *Scedosporium* sp, *Pseudallescheria* sp, *Exophiala* sp, *Alternaria* sp, *Cladosporium* sp e *Bipolaris* sp, determinaram que o antifúngico posaconazol foi o mais ativo *in vitro*, seguido do itraconazol, terbinafina e anfotericina B. Espinel-Ingroff (18) relatou que o voriconazol foi o mais ativo *in vitro*, seguido de itraconazol e anfotericina B frente a isolados de *Alternaria* sp, *Bipolaris* sp e *Cladophialophora* sp.

O emprego da terbinafina no tratamento de doenças causadas por fungos demáceos vem sendo cada vez mais discutido, principalmente no tratamento de cromoblastomicoses (1,2). Existem bons resultados da utilização *in vivo* desse antifúngico em associação com azólicos e poliênicos (1,2,7,13,21,22).

5.2. Avaliação da suscetibilidade dos conídios dos isolados selecionados de fungos demáceos dos gêneros *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladophialophora*, *Curvularia*, *Exophiala* e *Fonsecaea*, frente a associação da terbinafina com itraconazol, voriconazol, e anfotericina B, através da técnica de microdiluição em caldo com a utilização da metodologia do tabuleiro de xadrez.

Nos testes de associação de antifúngicos, os valores obtidos para CIM foram muito menores que os obtidos na microdiluição em caldo, com os antifúngicos avaliados de forma não combinada, frente a todas as espécies avaliadas. Os resultados indicaram 100% de sinergismo nas interações entre terbinafina e voriconazol, 96,5% de sinergismo entre anfotericina B e terbinafina e 75,9% de sinergismo entre terbinafina e itraconazol (artigo 1, Tabela 1). Nenhum caso de antagonismo foi observado.

A associação de antifúngicos foi avaliada através da técnica de tabuleiro de xadrez que é capaz de apresentar os resultados de interações entre as drogas nas diferentes concentrações avaliadas onde é possível observar as reações de sinergismo (interação positiva), antagonismo (interação negativa) e indiferença (a combinação produz o mesmo resultado que o antifúngico mais ativo em separado). Bons resultados nas interações entre terbinafina e azólicos já eram esperados, pois estes antifúngicos agem em diferentes pontos da mesma via da biossíntese de ergosterol fúngico, com a terbinafina agindo na inibição da enzima escelano epoxidase e os azólicos na inibição da enzima 14- α -demetilase.

Os resultados obtidos na associação de terbinafina com azólicos estão de acordo com estudos de outros autores que também demonstraram sinergismo entre estas duas drogas para espécies de zigomicetos, *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladophialophora carrioni*, *Phialophora verrucosa*, *Scedosporium*, *Pythium* e *Aspergillus* sp (22,25,26,28,44).

Os valores de CIM de anfotericina B obtidos neste estudo foram reduzidos drasticamente quando foi realizada a associação com terbinafina. Esses resultados podem indicar que a combinação de terbinafina oral com a anfotericina parenteral poderia ser útil no tratamento de infecções invasivas causadas por fungos demáceos (12).

Outros autores apresentaram estudos com bons resultados na interação entre terbinafina e anfotericina B frente a zigomicetos (25). Entretanto, Yu *et al.* (12) relataram indiferença para essa mesma associação frente a alguns fungos demáceos que causam cromomicose na China, assim como Ortoneda *et al.* (27), que também relatou em seu estudo indiferença nesta mesma associação com isolados de *Paecilomyces* sp. Estudos publicados avaliando essa mesma associação de anfotericina B e terbinafina frente a *Aspergillus* sp apresentaram antagonismo frente a todos os isolados avaliados (14,21,45).

Uma possibilidade para explicar os bons resultados deste trabalho na associação entre anfotericina B e terbinafina seria o fato de que a exposição a tratamentos prévios e conjuntos desta associação resultariam numa membrana celular fragilizada devido à ação da anfotericina B, acarretando um aumento na permeabilidade à terbinafina e um consequente aumento na sua eficácia, resultando em baixos valores de CIM (12).

A associação de antifúngicos poderia se tornar uma ferramenta muito útil para infecções causadas por fungos demáceos, como tem sido demonstrado em outras infecções de difícil tratamento como a meningite criptocócica (1). Os resultados obtidos com a associação de antifúngicos *in vitro* são muito encorajadores, pois os antifúngicos avaliados demonstraram

em sua maioria, efeitos sinérgicos, seguidos de poucos relatos de indiferença, e nenhum caso de antagonismo foi observado.

5.3. Avaliação da suscetibilidade das hifas dos isolados selecionados de fungos demáceos dos gêneros *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladophialophora*, *Curvularia*, *Exophiala* e *Fonsecaea*, frente aos antifúngicos não combinados: terbinafina, itraconazol, voriconazol, e anfotericina B, através da avaliação dinâmica de crescimento.

Levando em consideração que o crescimento nas hifas ocorre na região apical, foi escolhida para a utilização neste estudo uma metodologia capaz de detectar automaticamente a extremidade das hifas e medir sua taxa de crescimento. O sistema BCT, utilizado para avaliação dinâmica de crescimento, gera informações em tempo real sobre a ação dos antifúngicos aplicados diretamente nas hifas.

Devido ao tempo despendido para realizar cada experimento no sistema BCT, foi escolhida apenas um isolado para representar cada gênero de fungos demáceos selecionados para este estudo. Para a escolha do isolado, foi considerada a que apresentou o menor tempo de crescimento e capacidade de produzir a maior quantidade de conídios.

A concentração dos antifúngicos utilizada como ponto de partida nos testes com hifas corresponde à concentração equivalente ao valor de CIM obtido para conídios na técnica de microdiluição em caldo. A partir da CIM, as concentrações foram reduzidas até a obtenção de uma taxa de inibição de crescimento fúngico inferior ou igual a 50% no período de exposição ao antifúngico. As concentrações que produziram valores de taxa de inibição do crescimento de hifas abaixo de 50% foram consideradas de baixa atividade antifúngica.

Como não há registros na literatura sobre o uso deste sistema automatizado para isolados de fungos demáceos, foi realizada uma padronização de todas as variáveis envolvidas, tais como: concentração e quantidade de inóculo, período e temperatura de incubação das

placas, intervalos de leitura e tempo de execução do teste. Os resultados obtidos com esta padronização estão descritos no anexo 1 (tabela 6).

Com o uso do equipamento BCT foi possível observar o crescimento das hifas dos isolados dos fungos demáceos em tempo real bem como o seu comportamento frente aos antifúngicos isolados. Wei-Yun-Zhu e Gooday (46) demonstraram que existem diferenças na característica física de hifas jovens em comparação com as hifas maduras. Essas diferenças podem causar variações de sensibilidade ou resistência no uso de antifúngicos. Foi reportado que hifas jovens de *Botrytis cinerea* e *Mucor rouxii* crescem devagar e apresentam menor suscetibilidade aos agentes antifúngicos do que as hifas maduras (40,46). Teixeira (15) demonstrou que hifas jovens de *Fusarium* spp. cresceram mais rápido e foram menos susceptíveis aos agentes antifúngicos do que hifas maduras. Corrêa (29) não observou diferenças na suscetibilidade entre hifas jovens e maduras de dermatófitos, frente aos agentes antifúngicos avaliados.

No presente trabalho, foi possível notar que as hifas dos isolados de fungos demáceos avaliadas são largas e pardas, com septos bem definidos, com exceção da *Cladophialophora bantiana*, que possui hifas finas. Quando foi colocado o antifúngico em contato direto com as hifas também não foi possível observar diferenças, no decorrer do experimento, entre jovens e maduras, pois ambas responderam da mesma forma aos agentes antifúngicos. Porém, quando o antifúngico foi adicionado observou-se que as hifas tanto jovens como maduras, se tornaram mais finas. A princípio, esta diferença poderia estar influenciando nos valores de CIM avaliados, sendo minimizada pela análise estatística que considerou apenas a mediana de crescimento (15).

A CIM para hifas foi definida como a menor concentração de antifúngicos que produziu uma queda abrupta na curva de crescimento, resultando em uma taxa de inibição de crescimento maior ou igual a 80% de inibição no período de pós-exposição ao antifúngico. A

determinação do tipo de atividade do antifúngico (fungicida ou fungistática) foi realizada a partir dos valores obtidos no período de pós-exposição.

Se o fungo voltou a apresentar crescimento em meio RPMI, após a remoção do antifúngico, foi considerado que o antifúngico apresentou uma atividade fungistática (crescimento Pós exp > Exp) frente a este isolado, o contrário, uma atividade fungicida (crescimento Exp > Pós exp) (exemplo Figura 13 – fungicida, Figura 26 – fungistático).

Os resultados obtidos com a avaliação dinâmica de crescimento revelaram que os valores de CIM para os antifúngicos avaliados isoladamente, frente às hifas de todos os isolados de fungos demáceos avaliados foram menores que os valores de CIM obtidos pra conídios, com o uso da técnica de microdiluição em caldo (Tabela 2, artigo 2).

Para todos os antifúngicos avaliados frente a maioria dos isolados, foi observada uma redução significativa na taxa de inibição de crescimento das hifas depois da segunda ou terceira concentração avaliada abaixo do valor de CIM obtido para conídios, durante ambos os períodos de exposição e pós-exposição ao antifúngico (Tabelas 1 e 2, artigo 2; Figuras 3 a 26). A avaliação de uma quarta concentração abaixo do valor de CIM obtido para os conídios só foi necessária para os isolados de *C. bantiana* e *C. clavata* frente a voriconazol (Tabela 1, artigo 2; Figuras 18 e 22).

Voriconazol e itraconazol foram os antifúngicos com maior atividade frente a conídios e hifas de todos os isolados avaliadas (Tabelas 1 e 2, artigo 2; Figuras 18 a 29), corroborando com estudos de outros autores sobre suscetibilidade a antifúngicos com fungos demáceos desenvolvidos por Fothergil *et al.* (11), Revankar (1) e Espinel-Ingroff (18). *C. bantiana* e *F. pedrosoi* demonstraram resistência a anfotericina B, com valores de CIM de 32.0 µg/mL para conídios e 16.0 µg/mL para hifas.

Teixeira *et al.* (32,35) avaliaram em seus estudos isolados de *Fusarium* sp e *Aspergillus* sp com a utilização do sistema BCT e demonstraram resultados similares aos

obtidos neste trabalho, com valores mais baixos de CIM para as hifas quando comparado aos valores obtidos para os conídios, assim como Correa (29), para dermatófitos. Fernandez-Torres *et al.* (34) revelaram em seu estudo valores mais altos de CIM para os conídios do que para hifas de dermatófitos frente a terbinafina, itraconazol e voriconazol, utilizando uma suspensão de fragmentos de hifas na metodologia de microdiluição em caldo.

Os estudos de Van de Sande *et al.* (31) e Wetter *et al.* (33) reportaram valores similares de CIM para conídios e hifas de *Aspergillus fumigatus* frente a anfotericina B, itraconazol e voriconazol, com a utilização do ensaio XTT e ensaio hRSA respectivamente. Em contradição, Guarro *et al.* (36) obtiveram valores maiores de CIM para conídios do que para hifas de *C. bantiana* e outros fungos filamentosos frente a itraconazol e voriconazol, utilizando uma suspensão de fragmentos de hifas na metodologia de microdiluição em caldo.

Os valores de taxa de inibição de crescimento das hifas pra anfotericina B e voriconazol, obtidos no período de pós-exposição ao antifúngico, foram maiores dos que os obtidos no período de exposição ao antifúngico, sugerindo uma ação fungicida destes antifúngicos para todos os isolados avaliados (Tabela 1, artigo 2; Figuras 12 a 23). Em oposição, o contrário foi observado para terbinafina e itraconazol, sugerindo uma ação fungistática destes antifúngicos para os isolados avaliados. Comparando estes resultados com os valores de CFM obtidos para as formas de conídios, podemos observar que eles são similares, para os mesmos antifúngicos e isolados avaliados (Tabela 2, artigo 2; Figuras 6 a 11 e 24 a 29).

5.4. Avaliação da suscetibilidade das hifas dos isolados selecionados de fungos demáceos dos gêneros *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladophialophora*, *Curvularia*, *Exophiala* e *Fonsecaea*, frente a associação de terbinafina com itraconazol, voriconazol, e anfotericina B, através da avaliação dinâmica de crescimento.

A associação de antifúngicos poderia ser uma alternativa para aumentar a efetividade de cada droga e melhorar a eficácia do tratamento utilizando dosagens menores, especialmente em tratamentos sem resposta ao antifúngico administrado de forma isolada (12).

A maioria dos estudos de associação de antifúngicos *in vitro* utiliza conídios, com a aplicação da técnica do tabuleiro de xadrez. Entretanto, a realização de testes de suscetibilidade utilizando hifas poderia mimetizar as características do fungo no tecido infectado, demonstrando de forma mais clara o potencial terapêutico do antifúngico (31)

Existem pouquíssimos estudos sobre testes de suscetibilidade *in vitro* que empregam hifas como inóculo (31,33,36,47,48), e menos ainda estudos que fazem essa avaliação da suscetibilidade de hifas utilizando a associação de antifúngicos (39,41,47) e nenhum deles avaliou fungos demáceos.

Os estudos de avaliação da suscetibilidade a antifúngicos que utilizam hifas como inóculo apresentam resultados variáveis, fato que poderia ser explicado pelo uso de diferentes tipos de inóculos de hifas e também de diferentes metodologias para a execução do teste.

Guarro *et al.* (36) utilizaram em seu estudo um inóculo de fragmentos filtrados de hifas de várias espécies de fungos filamentosos na técnica de microdiluição em caldo frente a vários antifúngicos. Wetter *et al.* (33) utilizaram um inóculo de hifas de *Aspergillus fumigatus* gerado através da incubação de conídios e realizaram o teste de suscetibilidade frente a anfotericina B, itraconazol e voriconazol, com a metodologia de ensaio rápido de suscetibilidade (hRSA), onde são analisados os níveis residuais de glicose. Van de Sande *et al.* (31), Spreghini *et al.* (37) e Perkhofer *et al.* (47,48) utilizaram em seus estudos com hifas o ensaio XTT, com objetivo de medir a inibição da atividade metabólica de isolados de *Aspergillus* sp e zigomicetos frente a antifúngicos puros e em combinação, baseado no uso de sal de tetrazolium como indicador.

Oh *et al.* (39) utilizaram o sistema BCT para avaliar a ação da associação de anfotericina B e fluocitosina no crescimento de pseudo-hifas de *Candida albicans* e Taguchi *et al.* (41) também utilizaram este mesmo sistema para avaliar a inibição do crescimento de hifas de *Aspergillus fumigatus* frente a associação de anfotericina B e fluocitosina.

No presente estudo, para aos testes de combinação de antifúngicos frente a hifas, as concentrações iniciais avaliadas foram as CIMs obtidas para cada antifúngico na metodologia do tabuleiro de xadrez, usando conídios. A partir da CIM, as concentrações foram reduzidas até a obtenção de uma taxa de inibição de crescimento fúngico inferior ou igual a 50% no período de exposição ao antifúngico. As concentrações que produziram valores de taxa de inibição do crescimento de hifas abaixo de 50% foram consideradas de baixa atividade antifúngica.

Os valores de CIM obtidos para associação de antifúngicos com o sistema de avaliação dinâmica do crescimento, utilizando hifas, foram menores dos que os valores obtidos com os conídios na metodologia do tabuleiro de xadrez, sendo em alguns casos duas ou três concentrações menores (Tabelas 3 e 4, artigo 2; Figuras 30 a 47).

Os resultados deste trabalho demonstraram 100% de sinergismo para todas as associações de antifúngicos frente as hifas de todos os isolados de fungos dos gêneros selecionados (Tabela 4, artigo 2, Figuras 30 a 47). Os bons resultados na associação de terbinafina e os azólicos já eram esperados, em concordância com outros autores (12,25,26).

Todavia, a anfotericina B interage com o ergosterol da membrana, provocando poros e consequente extravasamento do material celular, o que leva alguns autores a afirmarem que provocaria antagonismo na associação entre terbinafina e anfotericina B, pois haveria menos ergosterol na membrana do fungo como alvo da anfotericina B (12,14). Este fato não ocorreu neste presente estudo, com 100% de sinergismo para todos os isolados avaliadas frente a associação de terbinafina e anfotericina B (Tabela 4, artigo 2).

Oh e *et al.* (39) demonstraram sinergismo utilizando o sistema BCT para avaliar a ação da associação de anfotericina B e fluocitosina no crescimento das pseudo-hifas de *Candida albicans*. Taguchi *et al.* (41), também obtiveram sinergismo na associação de anfotericina B e fluocitosina na inibição do crescimento de hifas de *Aspergillus fumigatus*, utilizando o BCT.

Perkhofer *et al.* (47), utilizando o ensaio XTT para avaliar a inibição da atividade metabólica baseado no uso do sal de tetrazolium como indicador, relataram indiferença entre voriconazol e anidulafungina para hifas de *Aspergillus* spp.

Também foi avaliada neste presente estudo a interferência da ordem de adição dos antifúngicos, depositando o primeiro por uma hora e depois deste período, acrescentamos o outro, os dois na concentração equivalente a CIM da associação obtida pela técnica de tabuleiro de xadrez. Não foram observados valores altos de taxa de inibição de crescimento frente aos isolados avaliados exceto para a combinação de anfotericina B e terbinafina, onde houveram valores altos de CIM no período de pós-exposição quando foi colocado primeiro a anfotericina B e depois a terbinafina (anexo 12 Tabela 7). Esse resultado é atribuído ao fato de que as concentrações correspondentes aos valores de CIM, dos antifúngicos em associação, obtidas na metodologia do tabuleiro de xadrez, são muito baixas, impedindo a ação contra o fungo (Anexo 12). Porém, essas mesmas concentrações combinadas aplicadas ao mesmo tempo tiveram efeito sinérgico, com altas taxas de inibição (Tabelas 3 e 4, artigo 2).

A avaliação da inibição do crescimento de hifas pode ser considerada uma metodologia capaz de avaliar a suscetibilidade a antifúngicos, principalmente em patógenos fúngicos que produzem um pequeno número de esporos e também um método capaz de mimetizar as características dos fungos no tecido infectado sendo, portanto, de grande importância para prever o potencial terapêutico do antifúngico.

6. CONCLUSÕES

- O antifúngico voriconazol não combinado foi o mais ativo frente as formas de conídios dos isolados de: *Alternaria* sp, *Bipolaris* sp, *Cladophialophora* sp, *Curvularia* sp, *Exophiala* sp e *Fonsecaea* sp, avaliadas na metodologia de microdiluição em caldo, seguido do itraconazol e da terbinafina. A anfotericina B apresentou os valores de CIM mais altos, sendo, portanto o antifúngico menos ativo.
- Na avaliação da associação entre os antifúngicos, frente aos conídios dos isolados de: *Alternaria* sp, *Bipolaris* sp, *Cladophialophora* sp, *Curvularia* sp, *Exophiala* sp e *Fonsecaea* sp, através da técnica de microdiluição em caldo com a utilização da metodologia do tabuleiro de xadrez, os resultados indicaram 100% de sinergismo nas associações entre terbinafina e voriconazol, 96,5% de sinergismo entre anfotericina B e terbinafina e 75,9% de sinergismo nas interações entre terbinafina e itraconazol. Não houve nenhum caso de antagonismo.
- Na avaliação da suscetibilidade das hifas, para todos os antifúngicos avaliados sem combinação, utilizando a avaliação dinâmica de crescimento, foi observada uma grande redução na taxa de inibição de crescimento depois da segunda ou terceira concentração avaliada abaixo do valor da CIM, obtida para conídios, durante ambos os períodos de exposição e pós-exposição ao antifúngico. Voriconazol e itraconazol demonstraram maior atividade frente às hifas dos isolados avaliadas, seguidos de terbinafina e anfotericina B. Não houve, no geral, diferença na suscetibilidade de hifas entre os gêneros de fungos demáceos avaliados, exceto para os isolados de *C. bantiana* e *F. pedrosoi* que apresentaram altos valores de CIM frente a anfotericina B.
- Na avaliação da suscetibilidade de hifas frente aos antifúngicos em associação ocorreu 100% de sinergismo para todos os isolados avaliados frente a associação de terbinafina com anfotericina B, voriconazol e itraconazol. Os valores de CIM dos antifúngicos em associação,

obtidos para as hifas na avaliação dinâmica de crescimento, foram muito menores do que os valores obtidos para os conídios.

- Concluindo, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a forma de hifas dos isolados avaliados de: *Alternaria* sp, *Bipolaris* sp, *Cladophialophora* sp, *Curvularia* sp, *Exophiala* sp e *Fonsecaea* sp, é mais suscetível que a de conídios frente aos antifúngicos tanto quando avaliados isoladamente, como em associação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- **Revankar SG.** Dematiaceous fungi. *Mycoses*, 2007, 50: 91-101.
- 2- **De Hoog GS, Queiroz-Telles F, Haase G, Fernandez-Zeppenfeldt G, Attili Angelis D, Guerrits Van Den Ende AH, et al.** Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med Mycol*, 2000, 38(1): 243-250.
- 3- **Lacaz CS, Porto E, Martins JEC.** *Micologia Médica: Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico.* 9.ed., São Paulo, Sarvier, 2002.
- 4- **Meletiadis J, Meis JF, De Hoog S, Verweij PE.** *In vitro* susceptibilities of 11 clinical isolates of *Exophiala* species to six antifungal drugs. *Mycoses*, 2000, 43: 309-312.
- 5- **Alves F, Figueras C, Roselló E.** Infecciones fúngicas invasivas emergentes. *An Pediatr (Barc)*, 2010, 73 (1): 52.e1-52.e6.
- 6- **Sidrin JJC, Moreira JLB, Rocha MFB.** *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos.* Editores: Sidrin J.J.C. and Rocha M.F.G. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004.
- 7- **Pang KR, Wu JJ, Huang DB, Tyring SK.** Subcutaneous fungal infections. *Dermatol Terapy*, 2004,17: 523-531.
- 8- **Suh MK.** Phaeohyphomycosis in Korea. *Jpn J Med Mycol* 2005, 46: 67-70.
- 9- **Kantarcioglu AS, De Hoog GS.** Infections of the central nervous system by melanized fungi: a review of the cases presented between 1999 and 2004. *Mycoses*, 2004, 47:4-13.
- 10- **Andrade TS, Castro LGM, Nunes RS, Gimenes VM, Cury AE.** Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses*, 2004, 47: 216-221.
- 11- **Fothergill AW, Rinaldi MG, Sutton DA.** Antifungal susceptibility testing of *Exophiala* spp.: a head-to-head comparison of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *Med Mycol*, 2009, 47: 41-43.
- 12- **Yu J, Ruoyu L, Zhang M, Liu L, Wan Z.** *In vitro* interactions of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblastomycosis in China. *Med Mycol*, 2008, 46: 745-747.
- 13- **Kondo M, Hiruma M, Nishioka Y, Mayuzumi N, Mochida K, Ikeda S, et al.** A case of cromomycosis caused by *Fonsecae pedrosoi* and a review of reported cases of dematiaceous fangal infections in Japan. *Mycoses*, 2005, 48: 221-225.

- 14- Cuenca-Estrella M.** Combinations of antifungal agents in therapy-what value are they? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, 54: 854-869.
- 15- Teixeira ABA.** Avaliação de suscetibilidade a antifúngicos pelo Sistema BioCell-Tracer[®] de monitorização de crescimento de hifas de espécies de *Aspergillus* e *Fusarium*, 2006. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas).
- 16- Clinical and Laboratory Standards Institute.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. CLSI 2008. Approved standard M38-A2.
- 17- McGinnis MR, Pasarel L.** *In vitro* testing of susceptibilities of filamentous ascomycetes to voriconazole, Itraconazole and Amphotericin B, with consideration of phylogenetic implications. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(8): 2353-2355.
- 18- Espinel-Ingroff A.** *In vitro* fungicidal activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(3):954-958.
- 19-Ruíz-Cendoya M, Rodriguez MM, Mariné M, Pastor FJ, Guarro J.** *In vitro* interactions of itraconazole and micafungin against clinically important filamentous fungi. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2008, 32: 418-420.
- 20- Vitale RG, De-Hoog GS, Verweij PE.** *In vitro* activity of amphotericin B, itraconazole, terbinafine and 5-fluocytosine against *Exophiala spinifera* and evaluation of post-antifungal effects. *Med Mycol*, 2003,41(4):301-307.
- 21- Krishnan-Natesan S, Chandrasekar PH, Manavathu EK, Revankar SG.** Successful treatment of primary cutaneous *Aspergillus ustus* infection with surgical debridement and a combination of voriconazole and terbinafine. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2008, 62: 443-446.
- 22- Zhang J, Xi L, Lu C, Li X, Xie T, Zhang H et al.** Successful treatment for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea monophora*: a report of three cases in Guangdong, China. *Mycoses*, 2009, 52: 176-181.
- 23- Tudela JLR, Rodero L, Cuenca-Estrella M, Córdoba S.** III Curso Hispano-Argentino de Micología Médica: Determinación de la Resistencia a los antifúngicos em el Laboratorio – Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, 2001.

- 24- Eliopoulos GM, Moellering RC.** Antimicrobial combinations. In: Antibiotics in Laboratory Medicine, 3rd ed., p. 437, 1991.
- 25- Gómez-López A, Cuenca-Estrella M, Mellado E, Rodrigues-Tudela JL.** *In vitro* evaluation of combination of terbinafine with itraconazole or amphotericin B against *Zygomycota*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2003, 45: 199-202.
- 26- Argenta JS, Santurio JM, Alves SH, Pereira DI, Cavalheiro AS, Spanemberg A, et al.** *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. Antimicrob. Agents Chemother, 2008, 52(2): 767-769.
- 27- Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Pujol I, Yustes SC, Serena C et al.** *In vitro* interactions of approved and novel drugs against *Paecilomyces* spp. Antimicrob. Agents Chemother, 2004, 48(7): 2727-2729.
- 28- Meletiadis J, Mouton JW, Meis JF, Verweij PE.** *In vitro* drug interaction modeling of combinations of azoles with terbinafine against clinical *Scedosporium prolificans* isolates. Antimicrob. Agents Chemother, 2003, 47 (1): 106-117.
- 29- Corrêa F.S.** Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos de dermatófitos do gênero *Microsporum*, 2007. (Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas).
- 30- Krakhecke AG, Afonso E, Ferreira JC, Candido RC.** *In vitro* susceptibility testing of *M. gypseum* isolates from health cattle and soil samples against itraconazole, terbinafine, fluoconazole and topical veterinarian drugs. Mycopathologia, 2005, 159: 377-380.
- 31- Van de Sande WWJ, Tavakol M, Vianen WV, Bakker-Woudenberg IAJM.** The effects of antifungal agents to conidial and hyphal forms of *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol, 2010, 48: 48-55.
- 32- Teixeira ABA, Moretti ML, Machado HC, Nishimura K, Taguchi H, Schreiber AZ.** Evaluation of the inhibitory effect of amphotericin B on the apical growth of *F.solani* using the BioCell-Tracer[®] System. Mycoses, 2007; 50: 183-188.
- 33- Wetter TJ, Hazen KC, Cutler JE.** Comparison between *Aspergillus fumigatus* conidia and hyphae susceptibilities to amphotericin B, itraconazole and voriconazole by use of the mold rapid susceptibility assay. Med Mycol, 2005, 43: 525-532.

- 34- Fernandez-Torres B, Inza I, Guarro J.** Comparison of in vitro antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of dermatophytes with thick-wall macroconidia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 43(10): 3371-3372.
- 35- Teixeira ABA, Moretti ML, Trabasso P, Von Nowakonski A, Aoki FH, Vigorito AC et al.** Evaluation of *Fusarium solani* hyphae and conidia susceptibility to amphotericin B and itraconazole: study of a clinical case. *Mycopathologia*, 2005, 116(4):291-296.
- 36- Guarro J, Llop C, Aguilar C, Pujol I.** Comparison of in vitro antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, 41(12): 2760-2762.
- 37- Spreghini E, Orlando F, Giannini D, Barchiesi F.** In vitro and in vivo activities of posaconazole against zygomycetes with various degrees of susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65(10): 2158-63.
- 38- Matsuoka H, Li Y, Takekawa Y, Teraoka T.** Evaluation of antifungal volatile compounds on the basis of the elongation rate of a single hypha. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(12): 3779-3784.
- 39- Oh K, Yang HC, Matsuoka A, Kurata H.** Combined effect of amphotericin B and flucytosine on hypha growth of *Candida albicans* estimated at a single hypha level. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 1995, 33(3): 01-04.
- 40- Ansheng L, Taguchi H, Miyaji M, Nishimura K, Wu S.** Study on the hyphal responses of *Aspergillus fumigatus* to the antifungal agent by Biocell-Tracer. *Mycopathologia*, 1999, 148: 17-23.
- 41- Taguchi H, Miyaji M, Nishimura K, Xu M.** Studies on the synergistic effect of amphotericin B and 5-fluorocytosine on the growth rate of single hyphae of *Aspergillus fumigatus* by a biocell-tracer system. *Mycoscience*, 1995, 36: 341-344.
- 42- Bedout, C, Gómez BL, Restrepo A.** In vitro susceptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 1997, 39(3): 145-148.
- 43- Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendr C.A., Norris CC, Hare R et al.** In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2006, 50(6): 2009-2015.

- 44- Ryder NS, Leitner L.** Sinergistic interaction of terbinafine with triazoles or amphotericin B against *Aspergillus* species. *Med. Mycol*, 2001, 39: 91-95.
- 45- Kirkpatrick WR, Vallor AC, McAtee RK, Ryder NS, Fothergill AW, Rinaldi MG et al.** Combination therapy with terbinafine and amphotericin B in a rabbit model of experimental invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2005, 49(11): 4751-4753.
- 46- Wei-Yun Z, Gooday GW.** Effects of nikkomycin and echinocandin on differentiated and undifferentiated mycelia of *Botrytis cinerea* and *Mucor rouxii*. *Mycol. Res*, 1992, 96(5): 371-377.
- 47- Perkhofer S, Jost D, Dierich MP, Lass-Flor C.** Susceptibility testing of anidulafungin and voriconazole alone and in combination against conidia and hyphae of *Aspergillus* spp. under hypoxic conditions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52(5): 1873-1875.
- 48- Perkhofer S, Locher M, Cuenca-Estrella M, Ruchel R, Wurzner R, Dierich MP et al.** Posaconazole enhances the activity of amphotericin B against hyphae of zygomycetes in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52(7): 2636-2638.

8. ANEXOS

Anexo 1:

Tabela 6: Padronização do teste no sistema automatizado BioCell-Tracer para os gêneros de fungos demáceos avaliados.

Parâmetros avaliados	Parâmetros obtidos para os microrganismos					
	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Bipolaris sp</i>	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	<i>Exophiala jeanselmei</i>	<i>Curvularia clavata</i>	<i>Cladophialophora bantiana</i>
Meio para indução de esporulação	Agar batata	Agar batata	Agar batata	Agar batata	Agar batata	Agar batata
Concentração ideal de Poli-L-Lisina	0,04%	0,03%	0,05%	0,04%	0,04%	0,05%
Concentração do inóculo	≥10 ⁶ conídios/mL	≥10 ⁶ conídios/mL	≥10 ⁶ conídios/mL	10 ³ conídios/mL	≥10 ⁶ conídios/mL	10 ³ conídios/mL
Quantidade de inóculo	10µl	15µl	10µl	10 µl	10µl	10µl
Temperatura de incubação	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C
Tempo de incubação prévia	4 dias	5 dias	3 dias	4 dias	4 dias	4 dias
Temperatura de execução do teste	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C
Intervalos de leitura	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min
Duração do teste	3h e 30 min	3h e 30 min	3h e 30 min	3h e 30 min	3h e 30 min	3h e 30 min
Medida para avaliação estatística dos resultados	mediana	mediana	mediana	mediana	mediana	mediana

Anexo 2:

Representação gráfica da avaliação da suscetibilidade a terbinafina pura frente as hifas dos isolados de fungos demáceos no sistema de avaliação dinâmica de crescimento

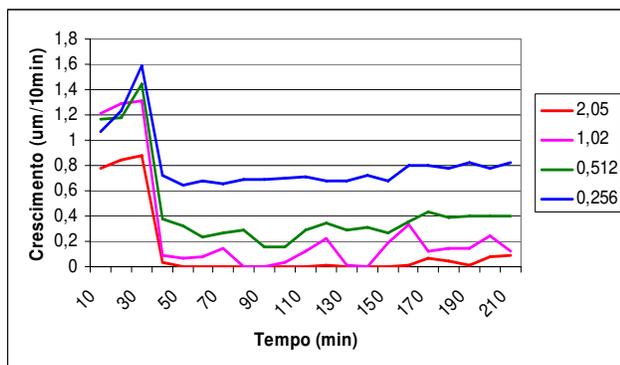


Figura 6: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF359 (*Curvularia clavata*) frente a concentrações (µg/mL) de terbinafina.

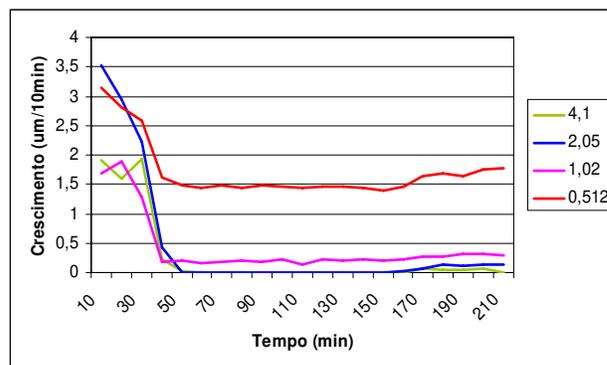


Figura 7: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF706 (*Fonsecaea pedrosoi*) frente a concentrações (µg/mL) de terbinafina.

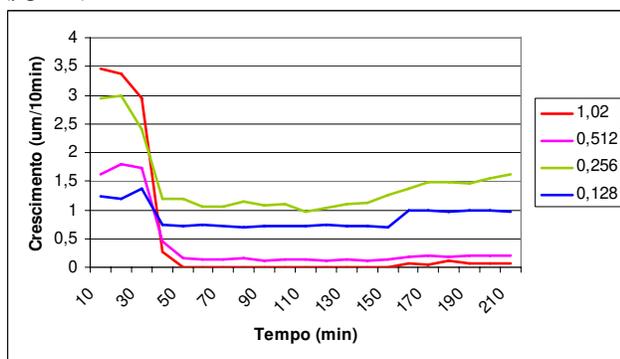


Figura 8: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF358b (*Alternaria alternata*) frente a concentrações (µg/mL) de terbinafina.

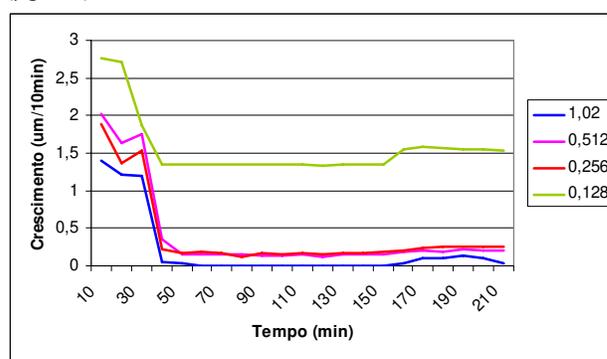


Figura 9: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado BipIAL (*Bipolaris sp*) frente a concentrações (µg/mL) de terbinafina.

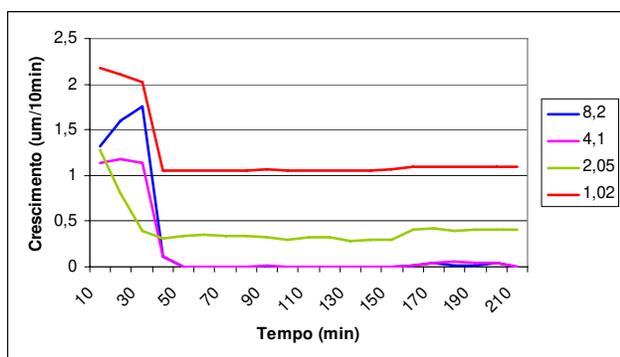


Figura 10: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado CladBoldrini1 (*Cladophialophora bantiana*) frente a concentrações (µg/mL) de terbinafina.

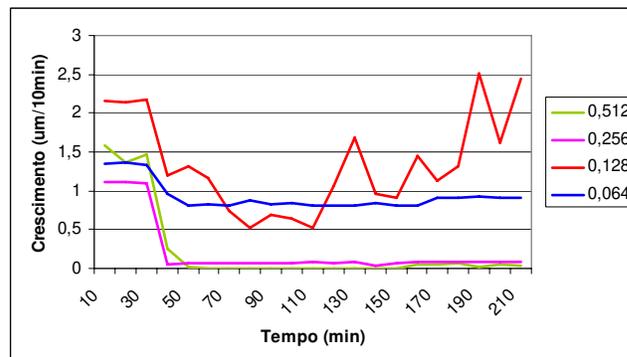


Figura 11: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF327 (*Exophiala jeanselmei*) frente a concentrações (µg/mL) de terbinafina.

Anexo 3:

Representação gráfica da avaliação da suscetibilidade a anfotericina B pura frente as hifas dos isolados de fungos demáceos no sistema de avaliação dinâmica de crescimento

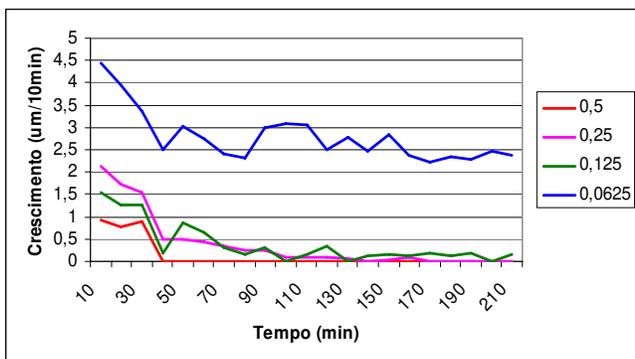


Figura 12: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF359 (*Curvularia clavata*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B.

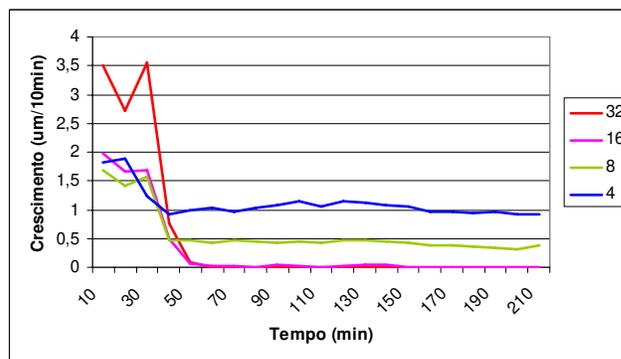


Figura 13: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF706 (*Fonsecaea pedrosoi*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B.

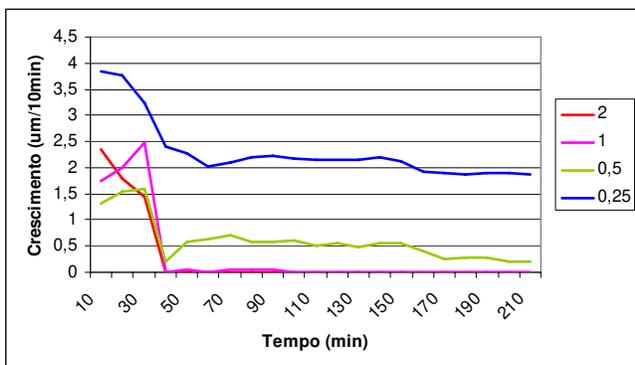


Figura 14: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF858b (*Alternaria alternata*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B.

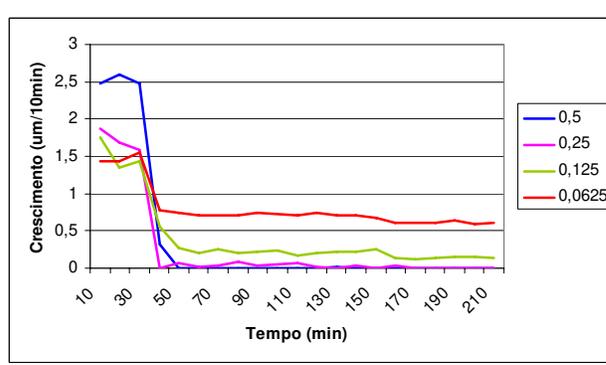


Figura 15: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado BipI (*Bipolaris* sp) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B.

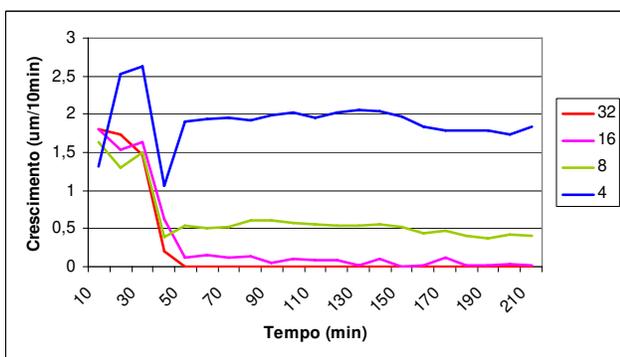


Figura 16: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado B1 (*Cladophialophora bantiana*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B.

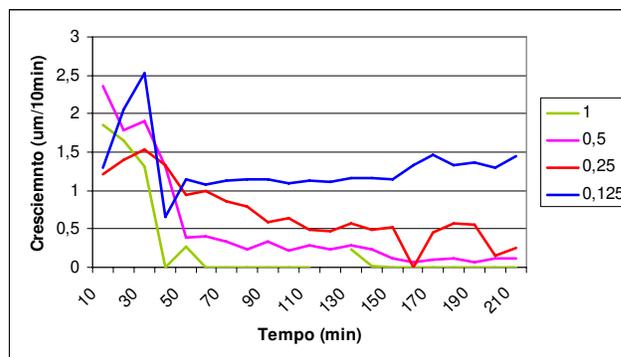


Figura 17: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF327 (*Exophiala jeanselmei*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B.

Anexo 4:

Representação gráfica da avaliação da suscetibilidade a voriconazol puro frente as hifas dos isolados de fungos demáceos no sistema de avaliação dinâmica de crescimento

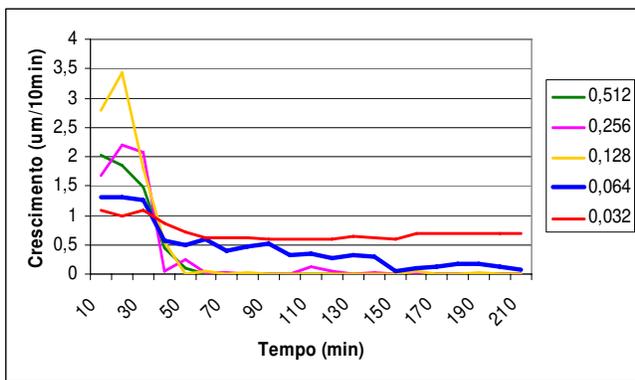


Figura 18: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF359 (*Curvularia clavata*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de voriconazol.

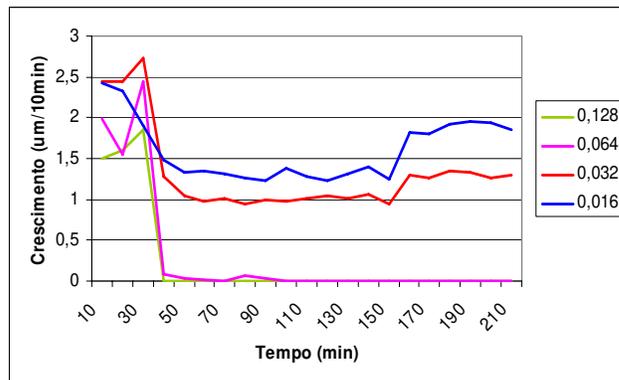


Figura 19: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF706 (*Fonsecaea pedrosoi*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de voriconazol.

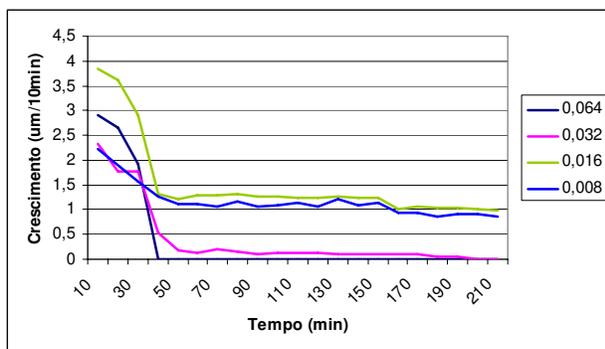


Figura 20: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF358b (*Alternaria alternata*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de voriconazol.

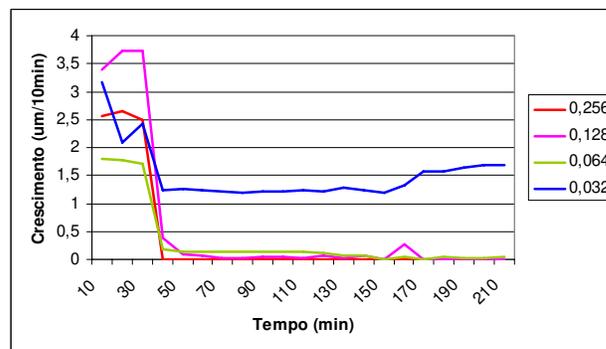


Figura 21: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado BipI (*Bipolaris* sp) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de voriconazol.

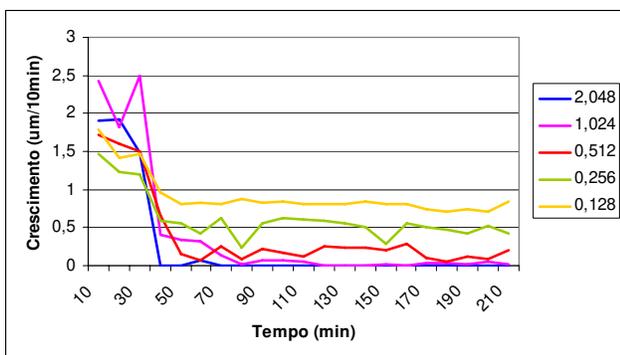


Figura 22: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado B1 (*Cladophialophora bantiana*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de voriconazol.

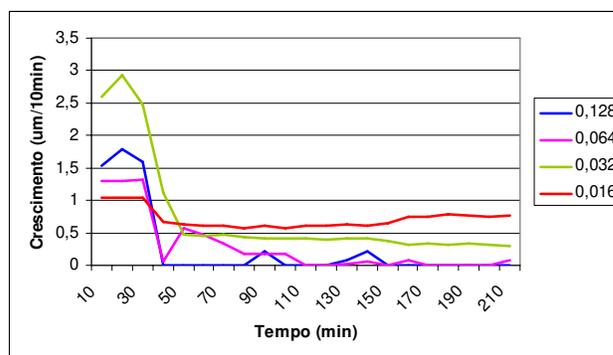


Figura 23: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF327 (*Exophiala jeanselmei*) frente a concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de voriconazol.

Anexo 5:

Representação gráfica da avaliação da suscetibilidade a itraconazol puro frente as hifas dos isolados de fungos demáceos no sistema de avaliação dinâmica de crescimento

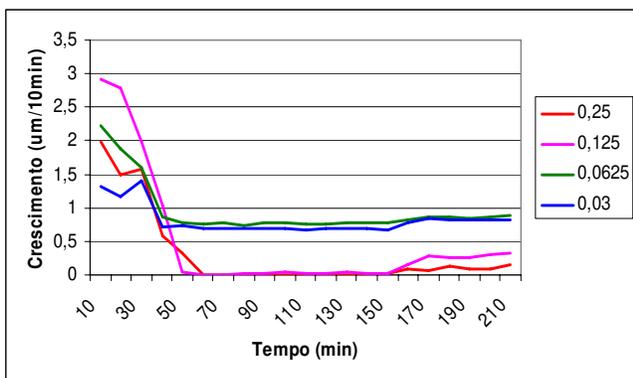


Figura 24: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF359 (*Curvularia clavata*) frente a concentrações (µg/mL) de itraconazol

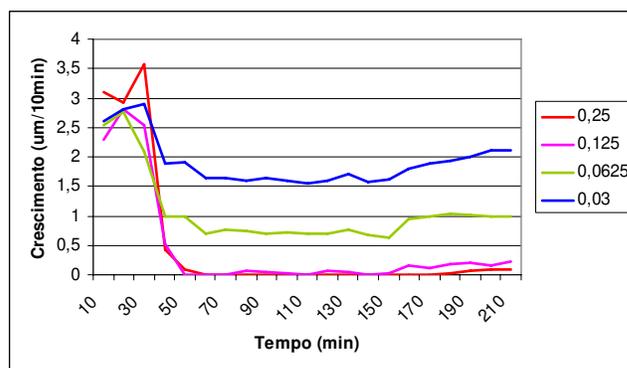


Figura 25: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF706 (*Fonsecaea pedrosoi*) frente a concentrações (µg/mL) de itraconazol.

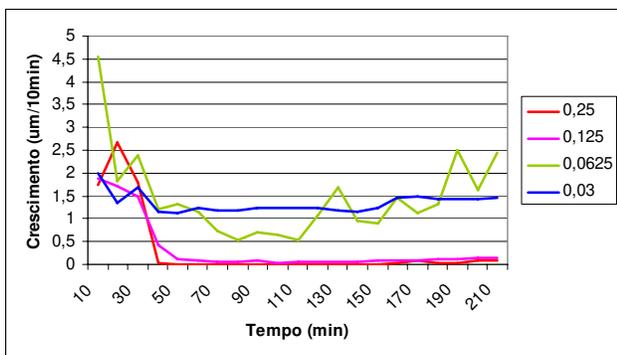


Figura 26: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF358b (*Alternaria* sp) frente a concentrações (µg/mL) de itraconazol.

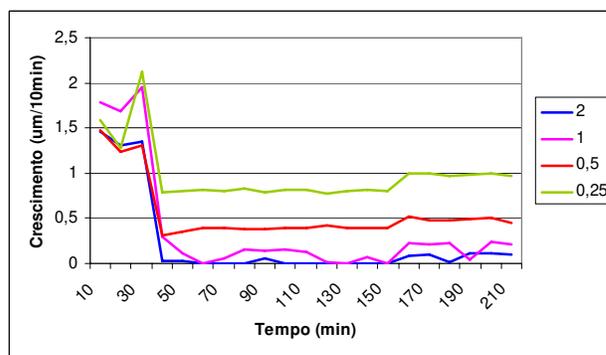


Figura 27: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado BipI (*Bipolaris* sp) frente a concentrações (µg/mL) de itraconazol.

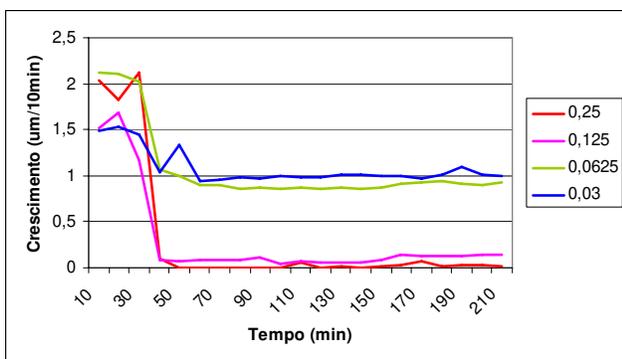


Figura 28: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado B1 (*Cladophialophora bantiana*) frente a concentrações (µg/mL) de itraconazol.

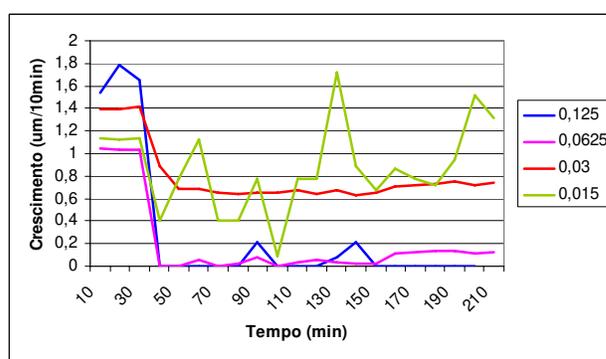


Figura 29: Avaliação da inibição de crescimento para o isolado LIF327 (*Exophiala jeanselmei*) frente a concentrações (µg/mL) de itraconazol.

Anexo 6:

Representação gráfica da avaliação da suscetibilidade da associação de terbinafina com anfotericina B, voriconazol e itraconazol frente as hifas de *Curvularia clavata* no sistema de avaliação dinâmica de crescimento.

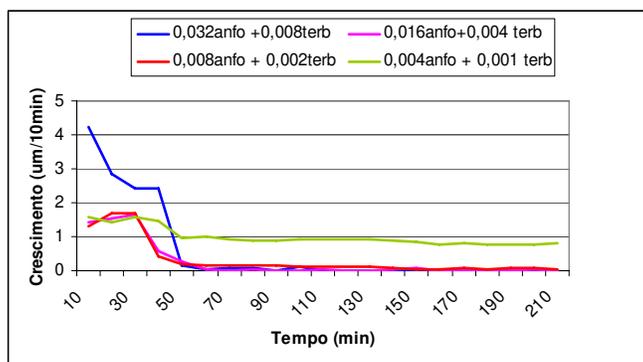


Figura 30: Representação gráfica da associação: anfotericina B + terbinafina frente a *C. clavata*

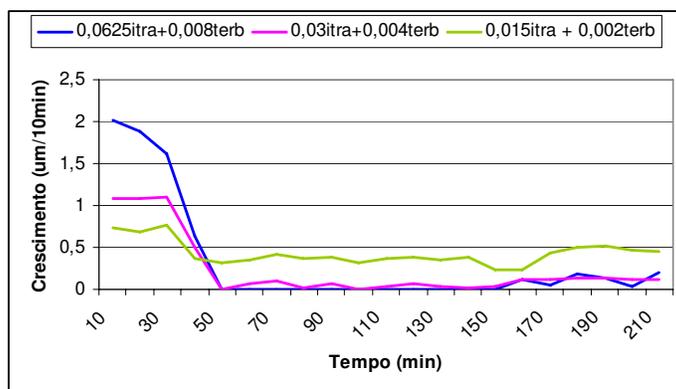


Figura 31: Representação gráfica da associação: itraconazol + terbinafina frente a *C. clavata*

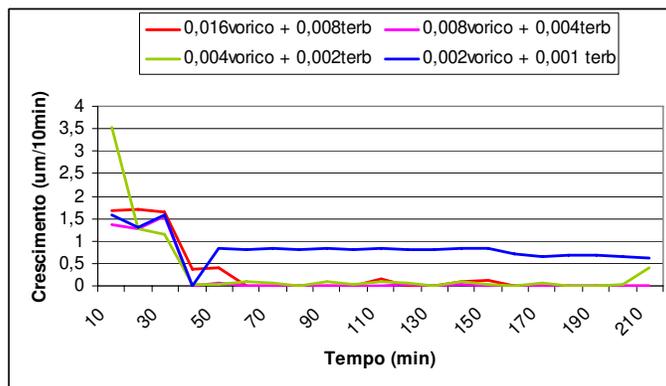


Figura 32: Representação gráfica da associação: voriconazol + terbinafina frente a *C. clavata*

Anexo 7:

Representação gráfica da avaliação da suscetibilidade da associação de terbinafina com anfotericina B, voriconazol e itraconazol frente as hifas de *Fonsecaea pedrosoi* no sistema de avaliação dinâmica de crescimento.

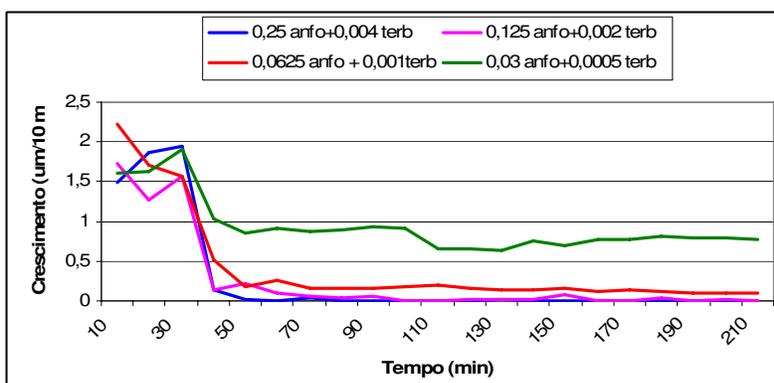


Figura 33: Representação gráfica da associação: anfotericina B + terbinafina frente a *F. pedrosoi*

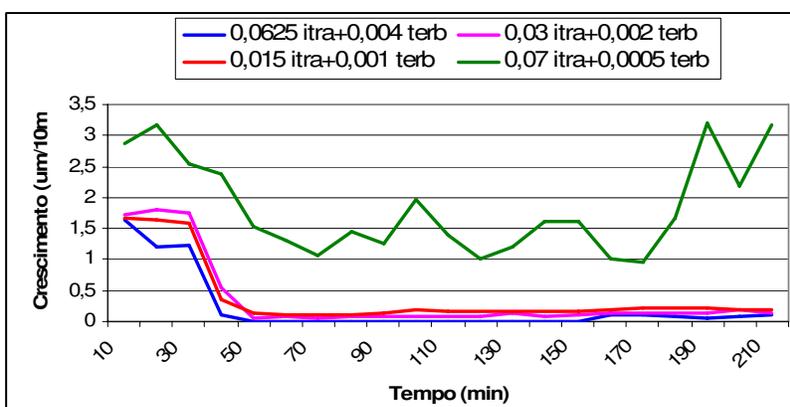


Figura 34: Representação gráfica da associação: itraconazol + terbinafina frente a *F. pedrosoi*

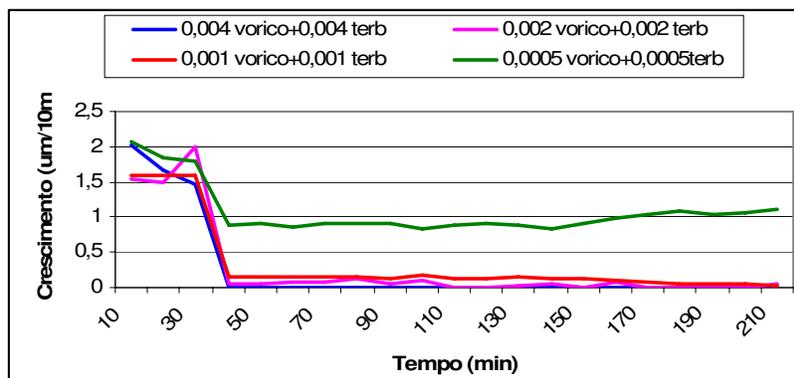


Figura 35: Representação gráfica da associação: voriconazol + terbinafina frente a *F. pedrosoi*

Anexo 8:

Representação gráfica da avaliação da suscetibilidade da associação de terbinafina com anfotericina B, voriconazol e itraconazol frente as hifas de *Alternaria alternata* no sistema de avaliação dinâmica de crescimento.

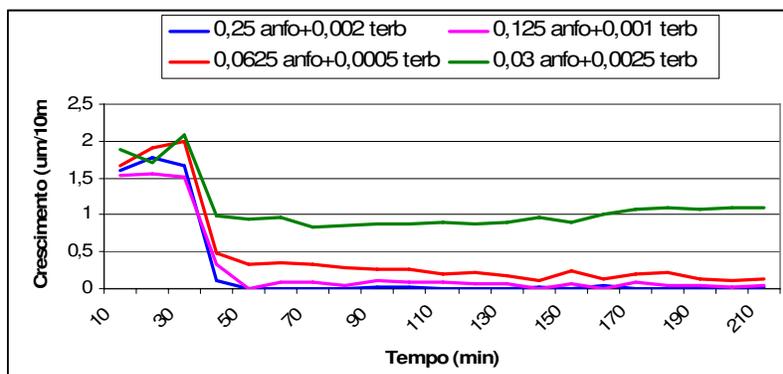


Figura 36: Representação gráfica da associação: anfotericina B + terbinafina frente a *A. alternata*

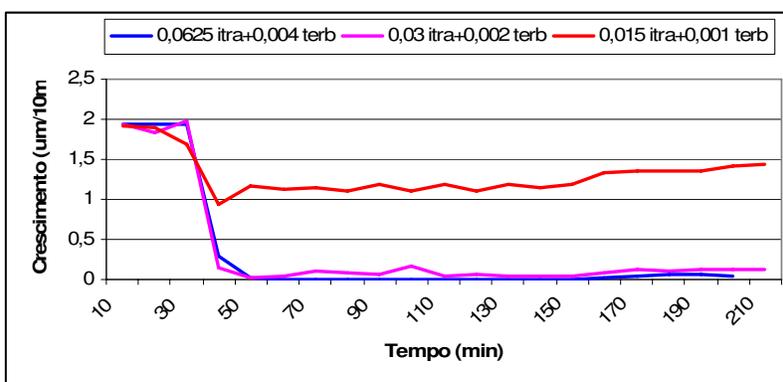


Figura 37: Representação gráfica da associação: itraconazol B + terbinafina frente a *A. alternata*

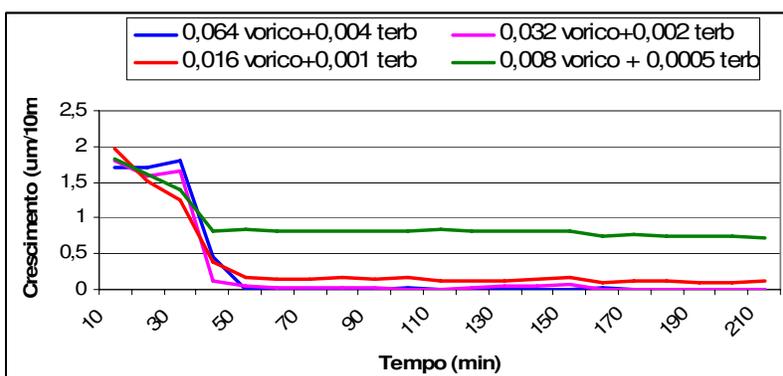


Figura 38: Representação gráfica da associação: voriconazol B + terbinafina frente a *A. alternata*

Anexo 9:

Representação gráfica da avaliação da suscetibilidade da associação de terbinafina com anfotericina B, voriconazol e itraconazol frente as hifas de *Bipolaris* sp no sistema de avaliação dinâmica de crescimento.

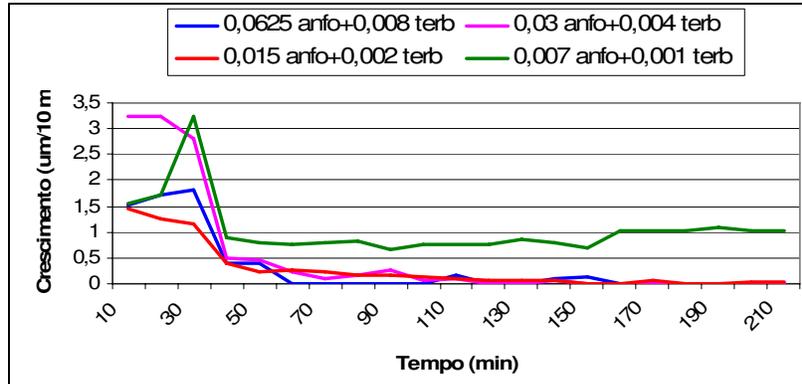


Figura 39: Representação gráfica da associação: anfotericina B + terbinafina frente a *Bipolaris* sp

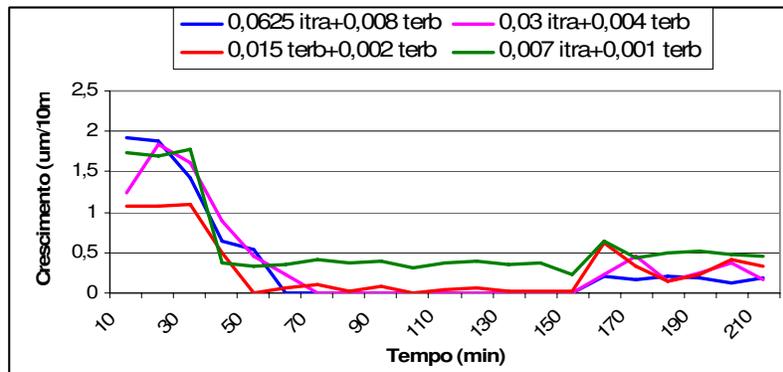


Figura 40: Representação gráfica da associação: itraconazol + terbinafina frente a *Bipolaris* sp

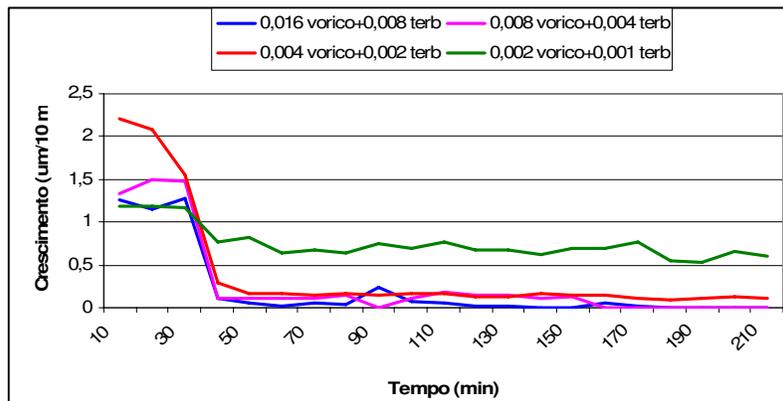


Figura 41: Representação gráfica da associação: voriconazol + terbinafina frente a *Bipolaris* sp

Anexo 10:

Representação gráfica da avaliação da suscetibilidade da associação de terbinafina com anfotericina B, voriconazol e itraconazol frente as hifas de *Cladophialophora bantiana* no sistema de avaliação dinâmica de crescimento.

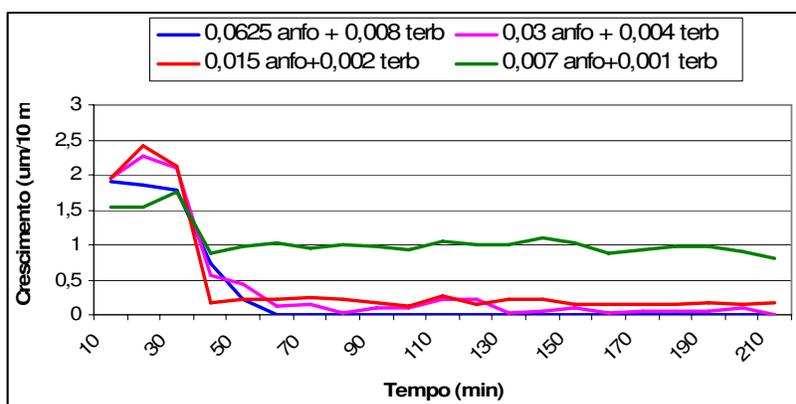


Figura 42: Representação gráfica da associação: anfotericina B + terbinafina frente a *C. bantiana*

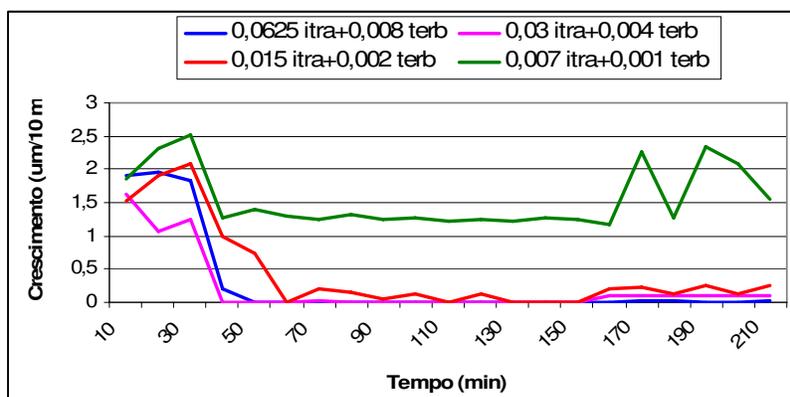


Figura 43: Representação gráfica da associação: itraconazol + terbinafina frente a *C. bantiana*

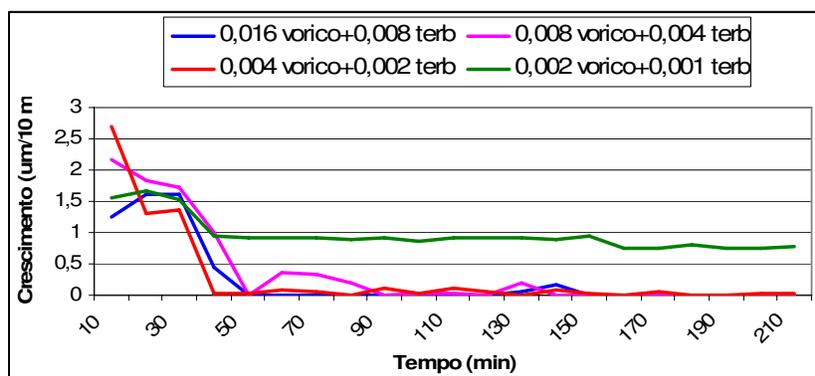


Figura 44: Representação gráfica da associação: voriconazol + terbinafina frente a *C. bantiana*

Anexo 11:

Representação gráfica da avaliação da suscetibilidade da associação de terbinafina com anfotericina B, voriconazol e itraconazol frente as hifas de *Exophiala jeanselmei* no sistema de avaliação dinâmica de crescimento.

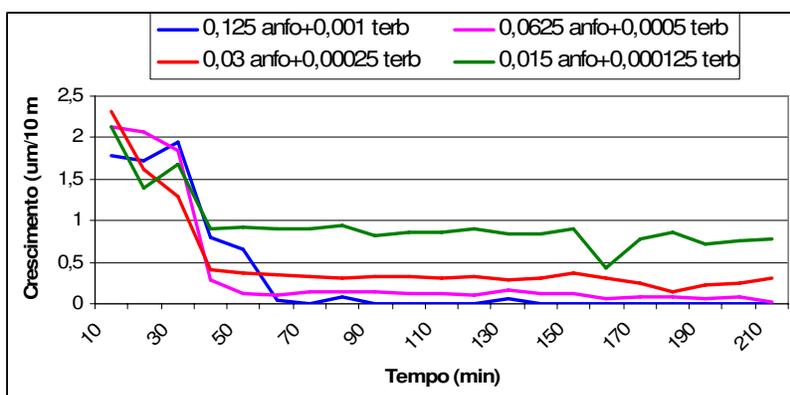


Figura 45: Representação gráfica da associação: anfotericina B + terbinafina frente a *E. jeanselmei*

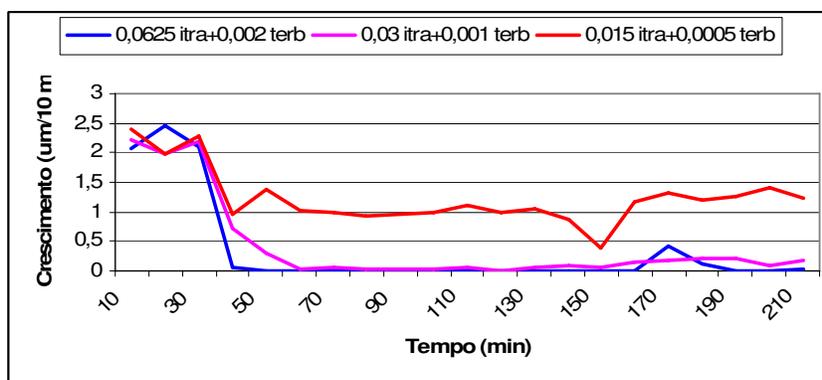


Figura 46: Representação gráfica da associação: itraconazol + terbinafina frente a *E. jeanselmei*

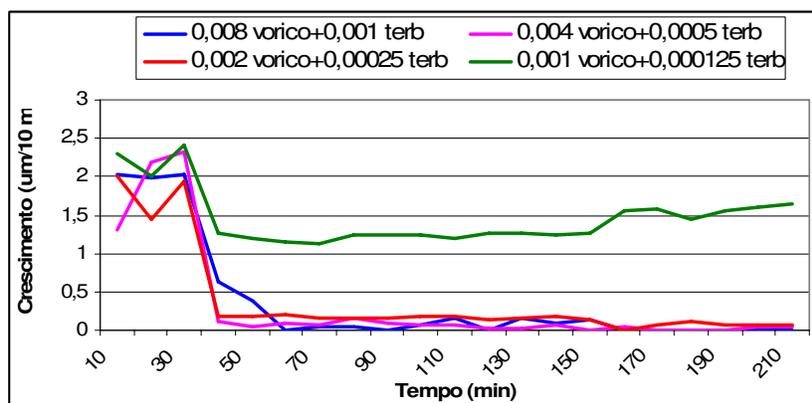


Figura 47: Representação gráfica da associação: voriconazol + terbinafina frente a *E. jeanselmei*

Anexo 12

Tabela 7: Taxa de inibição de crescimento dos isolados selecionados frente a associação de anfotericina B + terbinafina com interferência na ordem de adição nos períodos de exposição e pós-exposição ao antifúngico. na avaliação dinâmica de crescimento.

<i>Isolado</i>	<i>Primeira concentração de antifúngico a ser colocada**</i>	+	<i>Segunda concentração de antifúngico a ser colocada</i>	<i>Período</i>	<i>Taxa de Inibição</i>
<i>C. clavata</i>	0,032* anfo	+	0,008 terb	Exposição	3,3%
				Pós-exposição	100%
	0,008 terb	+	0,032 anfo	Exposição	3,5%
				Pós-exposição	30,4%
<i>F. pedrosoi</i>	0,25 anfo	+	0,004 terb	Exposição	41,2%
				Pós-exposição	99,5%
	0,004 terb	+	0,25 anfo	Exposição	18,7%
				Pós-exposição	26,5%
<i>A. alternata</i>	0,25 anfo	+	0,002 terb	Exposição	13%
				Pós-exposição	37,1%
	0,002 terb	+	0,25 anfo	Exposição	8,1%
				Pós-exposição	27,8%
<i>C. bantiana</i>	0,0625 anfo	+	0,008 terb	Exposição	27,3%
				Pós-exposição	72,7%
	0,008 terb	+	0,0625 anfo	Exposição	8,9%
				Pós-exposição	34,3%
<i>E. jeanselmei</i>	0,125 anfo	+	0,001 terb	Exposição	16,0%
				Pós-exposição	98,2%
	0,001 terb	+	0,125 anfo	Exposição	31,5%
				Pós-exposição	40,1%
<i>Bipolaris sp</i>	0,0625 anfo	+	0,008 terb	Exposição	20,7%
				Pós-exposição	100%
	0,008 terb	+	0,0625 anfo	Exposição	7,1%
				Pós-exposição	27,9%

*(µg/mL); ** Concentrações equivalentes ao valor de CIM obtidas para cada antifúngicos na associação de antifúngicos pela técnica de microdiluição em caldo.

Tabela 8: Taxa de inibição de crescimento dos isolados selecionados frente a associação de itraconazol + terbinafina com interferência na ordem de adição nos períodos de exposição e pós-exposição ao antifúngico. na avaliação dinâmica de crescimento.

<i>Isolado</i>	<i>Primeira concentração de antifúngico a ser colocada**</i>	+	<i>Segunda concentração de antifúngico a ser colocada</i>	<i>Período</i>	<i>Taxa de Inibição</i>
<i>C. clavata</i>	0,0625 itra	+	0,008 terb	Exposição	6,04%
				Pós-exposição	58,1%
	0,008 terb	+	0,0625 itra	Exposição	18,33%
				Pós-exposição	64,2%
<i>F. pedrosoi</i>	0,0625 itra	+	0,008 terb	Exposição	6,6%
				Pós-exposição	32,7%
	0,008 terb	+	0,0625 itra	Exposição	19,9%
				Pós-exposição	30,5%
<i>A. alternata</i>	0,0625 itra	+	0,008 terb	Exposição	3,9%
				Pós-exposição	18,7%
	0,008 terb	+	0,0625 itra	Exposição	16%
				Pós-exposição	20,4%
<i>C.bantiana</i>	0,0625 itra	+	0,008 terb	Exposição	5,4%
				Pós-exposição	19,3%
	0,008 terb	+	0,0625 itra	Exposição	8,6%
				Pós-exposição	21,4%
<i>E.jeanselmei</i>	0,0625 itra	+	0,008 terb	Exposição	43,3%
				Pós-exposição	56,3%
	0,008 terb	+	0,0625 itra	Exposição	51,9%
				Pós-exposição	51,1%
<i>Bipolaris sp</i>	0,0625 itra	+	0,008 terb	Exposição	3,8%
				Pós-exposição	46,3%
	0,008 terb	+	0,0625 itra	Exposição	20,4%
				Pós-exposição	54%

*(µg/mL); ** Concentrações equivalentes ao valor de CIM obtidas para cada antifúngicos na associação de antifúngicos pela técnica de microdiluição em caldo.

Tabela 9: Taxa de inibição de crescimento dos isolados selecionados frente a associação de voriconazol + terbinafina com interferência na ordem de adição nos períodos de exposição e pós-exposição ao antifúngico. na avaliação dinâmica de crescimento.

<i>Isolados</i>	<i>Primeira concentração de antifúngico a ser colocada**</i>	+	<i>Segunda concentração de antifúngico a ser colocada</i>	<i>Período</i>	<i>Taxa de Inibição</i>
<i>C. clavata</i>	0,016 vorico	+	0,008 terb	Exposição	31%
				Pós-exposição	51,1%
	0,008 terb	+	0,016 vorico	Exposição	10,7%
				Pós-exposição	49,6%
<i>F. pedrosoi</i>	0,004 vorico	+	0,004 terb	Exposição	84%
				Pós-exposição	80,1%
	0,004 terb	+	0,004 vorico	Exposição	26,5%
				Pós-exposição	41,7%
<i>A. alternata</i>	0,064 vorico	+	0,004 terb	Exposição	5,3%
				Pós-exposição	23,7%
	0,004 terb	+	0,064 vorico	Exposição	23,2%
				Pós-exposição	16%
<i>C.bantiana</i>	0,016 vorico	+	0,008 terb	Exposição	7,5%
				Pós-exposição	28,4%
	0,008 terb	+	0,016 vorico	Exposição	21,3%
				Pós-exposição	34,1%
<i>E.jeanselmei</i>	0,008 vorico	+	0,001 terb	Exposição	34,3%
				Pós-exposição	46,8%
	0,001 terb	+	0,008 vorico	Exposição	36,7%
				Pós-exposição	47,6%
<i>Bipolaris sp</i>	0,016 vorico	+	0,008 terb	Exposição	37%
				Pós-exposição	45%
	0,008 terb	+	0,016 vorico	Exposição	17,1%
				Pós-exposição	39,5%

*($\mu\text{g/mL}$); ** Concentrações equivalentes ao valor de CIM obtidas para cada antifúngicos na associação de antifúngicos pela técnica de microdiluição em caldo.