



Universidade de Brasília

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA
NÍVEL MESTRADO

CAMILA DA SILVA GOERSCH

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS INIBIDORES DA VIA DA
CALCINEURINA, TACROLIMUS E CICLOSPORINA A, EM FUNGOS PATOGÊNICOS DO
GÊNERO *Fonsecaea* sp.

BRASÍLIA

2021

CAMILA DA SILVA GOERSCH

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS INIBIDORES DA VIA DA
CALCINEURINA, TACROLIMUS E CICLOSPORINA A, EM FUNGOS PATOGÊNICOS DO
GÊNERO *Fonsecaea* sp.

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília – UnB, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Mestre em Biologia Microbiana.

Orientador (a): Prof.^a Dr. (a) Larissa Fernandes Matos

Brasília

2021

RESUMO

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea que causa lesões na epiderme e derme, está associada com trabalhadores rurais uma vez que seu agente patogênico é encontrado naturalmente em árvores e plantas, o ferimento causado por esses pode gerar a inoculação do fungo no organismo e o desenvolvimento da doença. Para avaliar a susceptibilidade dos fungos causadores de CBM às drogas que atuam inibindo a via da calcineurina foram realizados testes para determinar a concentração mínima inibitória (CIM) de inibidores FK506 e Ciclosporina A. Além disto, foi realizado um levantamento na literatura dos parâmetros e protocolos de referência utilizados para os ensaios com drogas antifúngicas para as espécies causadoras de CBM, uma vez que não há um consenso definido. Foi observado prevalência do sinergismo e efeito aditivo entre as drogas inibidoras da calcineurina com os antifúngicos analisados para três espécies de *Fonsecaea* com exceção da combinação entre ciclosporina A e itraconazol. A necessidade de novos alvos terapêuticos para tratar a CBM se dá pela ineficácia de vários compostos antifúngicos comercialmente disponíveis em que muitas vezes são necessárias altas doses para um bom desfecho do tratamento da CBM. Esta doença ainda possui um caráter recalcitrante, o que dificulta seu tratamento, e, por ser longo a taxa de abandono é significativamente alta. Dessa maneira, ao explorar esta via como possível alvo farmacológico pode-se contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento da doença.

Palavras-chave: Calcineurina. *Fonsecaea* sp. Concentração Inibitória Mínima. Cromoblastomicose.

ABSTRACT

Chromoblastomycosis (CBM) is a subcutaneous mycosis that causes damage to the epidermis and dermis, it is associated with employers since its pathogen is found naturally in trees and plants, the injury by these can generate an inoculation of the fungus in the body and the organism development of the disease. To assess the susceptibility of CBM-causing fungi to drugs that act by inhibiting the calcineurin pathway, tests were performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of FK506 and Cyclosporin A inhibitors. In addition, a survey in the literature of the parameters and reference protocols used for assays with antifungal drugs for species causing CBM was carried out, since there is no defined consensus. Prevalence of synergism and additive effect was observed between calcineurin inhibitory drugs and antifungal agents analyzed for three species of *Fonsecaea*, except for the combination between ciclosporin A and itraconazole. The need for new therapeutic targets to treat CBM is due to the ineffectiveness of several commercially available antifungal compounds in which high doses are often required for a good outcome of CBM treatment. This disease still has a recalcitrant character, which makes its treatment difficult, and, as it is long, the dropout rate is significantly high. Thus, exploring this pathway as a possible pharmacological target can contribute to the development of new strategies for the treatment of the disease.

Key words: Calcineurin. *Fonsecaea* sp. Minimum inhibitory concentration. Chromoblastomycosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - porcentagem

°C – graus Celsius

µg/mL – micrograma por mililitro

AA – Aminoácidos

ANB - Anfotericina B

CaM - Calmodulina

CBM - Cromoblastomicose

Cch1/Mid1- Canais de cálcio

CIM –Concentração Inibitória Mínima

Cna - Calcineurina

CnaA - Calcineurina subunidade catalítica A

CnaB - Calcineurina subunidade regulatória B

CRZ1 - Fator de transcrição

CsA - Ciclosporina A

CyA - Ciclofilina A

DTN - Doenças Tropicais Negligenciadas

FICI - Índice de concentração inibitória fracionada

FK506 - Tacrolimus

FKBP12 - Proteína de ligação ao FK506

FLZ – Fluconazol

HPH - Gene de resistência a Higromicina B

INT - 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazólio

ITZ - Itraconazol

MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

NFAT - Fator de ativação de células T

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação em cadeia da polimerase

TBF – Terbinafina

WST - (4-(3-4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazólio)-1,-3-benzenedisulfonato

XTT - 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

AGRADECIMENTOS

Palavras nunca serão suficientes para agradecer àqueles que me ajudaram na trajetória exaustiva de concluir uma pós-graduação.

Obrigada a CAPES pelo suporte financeiro.

Obrigada aos professores, cada um com sua devida importância.

Obrigada aos colegas de laboratório.

Obrigada à minha família e aos meus amigos.

Obrigada à Deus.

Por fim, mas não menos importante, obrigada a mim.

“É preciso que eu suporte duas ou três lagartas se quiser conhecer as borboletas.”

-Antoine de Saint-Exupéry

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da CBM de acordo com os casos reportados na literatura.....	Pag. 13
Figura 2 – Tipos de lesões de cromoblastomicose.....	Pag. 14
Figura 3A - Células muriformes ou escleróticas, achado patognomônico da CBM.....	Pag. 15
Figura 3B/C - Hifas de <i>F. pedrosoi</i> e células muriformes observados em microscópio de luz.....	Pag. 15
Figura 4 - Árvore filogenética das espécies de <i>Fonsecaea</i> baseada em alinhamento de sequencias (ITS) construída pelo método Neighbor joining utilizando o programa MEGA 6.0.....	Pag. 17
Figura 5 - Via de sinalização da calcineurina.....	Pag. 23
Figura 6 - Esquema da metodologia utilizada do ensaio para determinação da concentração mínima inibitória.....	Pag. 31
Figura 7 - Fluxograma do ensaio para determinação da CIM na presença do inibidor de melanina – triciclazol.....	Pag. 33
Figura 8 - Esquema da placa utilizada para o ensaio de checkerboard.....	Pag. 34
Figura 9 - Microscopia optica em aumento de 20x de <i>F. pedrosoi</i> , <i>F. monophora</i> e <i>F. nubica</i> em controle positivo de crescimento (espécie fúngica com adição de meio RPMI 1640), FK506 e ciclosporina A ambos em concentração de 64 µg/mL.....	Pag. 46
Figura 10 - Ensaio para avaliação da mínima concentração inibitória das drogas FK506, Ciclosporina A e Anfotericina B para a espécie fúngica <i>C. neoformans</i> , H99.....	Pag. 46
Figura 11 - Determinação da concentração mínima inibitória de triciclazol para <i>F. pedrosoi</i>	Pag. 48
Figura 12 - Determinação da CIM na presença de triciclazol para três drogas em quatro condições diferentes para o <i>F. pedrosoi</i>	Pag. 49
Figura 13 - Determinação da CIM na presença de triciclazol para três drogas em quatro condições diferentes para o <i>F. monophora</i>	Pag. 50
Figura 14 - Determinação da CIM na presença de triciclazol para três drogas em quatro condições diferentes para o <i>F. nubica</i>	Pag. 51
Figura 15 - Resultados dos testes de interação entre as drogas FK506 e itraconazol para o fungo <i>F. pedrosoi</i>	Pag. 54

Figura 16 -. Resultados dos testes de interação entre as drogas FK506 e itraconazol para o fungo <i>F. monophora</i>	Pag. 55
Figura 17 - Resultados dos testes de interação (checkerboard) entre as drogas FK506 e itraconazol para o fungo <i>F. nubica</i>	Pag. 56
Figura 18 - Resultados dos testes de interação entre as drogas FK506 e anfotericina B para o fungo <i>F. pedrosoi</i>	Pag.58
Figura 19 - Resultados dos testes de interação entre as drogas FK506 e anfotericina B para o fungo <i>F. monophora</i>	Pag. 58
Figura 20 . Resultados dos testes de interação entre as drogas FK506 e anfotericina B para o fungo <i>F. nubica</i>	Pag. 59
Figura 21 . Resultados dos testes de interação (checkerboard) entre as drogas ciclosporina A e anfotericina B para o fungo <i>F. pedrosoi</i>	Pag. 62
Figura 22 . Resultados dos testes de interação (checkerboard) entre as drogas ciclosporina A e anfotericina B para o fungo <i>F. monophora</i>	Pag. 63
Figura 23 . Resultados dos testes de interação (checkerboard) entre as drogas ciclosporina A e anfotericina B para o fungo <i>F. nubica</i>	Pag. 64
Figura 24 . Resultados dos testes de interação (checkerboard) entre as drogas ciclosporina A e itraconazol para o fungo <i>F. pedrosoi</i>	Pag. 66
Figura 25 . Resultados dos testes de interação (checkerboard) entre as drogas ciclosporina A e itraconazol para o fungo <i>F. monophora</i>	Pag. 67
Figura 26 . Resultados dos testes de interação (checkerboard) entre as drogas ciclosporina A e itraconazol para o fungo <i>F. nubica</i>	Pag. 68
Tabela 1 - Soluções estoque das drogas utilizadas nos ensaios.....	Pag. 31
Tabela 2 - Relação entre os valores de FICI e o efeito da combinação das drogas.....	Pag. 34
Tabela 3 - Valores de CIM para anfotericina B, Itraconazol e fluconazol dos artigos levantados para o presente trabalho.....	Pag. 39
Tabela 4 - Ensaios de susceptibilidade antifúngica contra agentes causadores da Cromoblastomicose de 1997 a 2019.....	Pags. 41 e 42
Tabela 5 - Valores de CIM em µg/mL das drogas inibitórias da via da Cna e antifúngicos para as três espécies estudadas.....	Pag. 45

Sumário

1. Introdução.....	11
1.1 Cromoblastomicose	11
1.2 Gênero <i>Fonsecaea</i> e a doença.....	15
1.3 Tratamento.....	19
1.4 Via de sinalização da calcineurina	22
1.5 Via de sinalização da calcineurina como alvo terapêutico.....	25
Justificativa	27
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. Materiais e Métodos	28
3.1 Condições de cultivo e manutenção das linhagens de <i>Fonsecaea</i>.....	28
3.2 Revisão bibliográfica	30
3.3 Determinação da concentração mínima inibitória (CIM)	30
3.4 Ensaio para determinação da concentração mínima inibitória com o inibidor de melanina – Triciclazol.....	32
3.5 Teste de interação entre as drogas - ensaio de Checkerboard.....	34
3.6 Microscopia Óptica	36
4. Resultados e Discussão.....	37
Condições e parâmetros utilizados para a determinação da CIM em fungos causadores de Cromoblastomicose	37
Avaliação da viabilidade celular por meio do indicador de oxido-redução, Resazurina em ensaio para determinação CIM de <i>Fonsecaea</i> sp	43
Determinação da CIM de <i>F. pedrosoi</i>, <i>F. monophora</i> e <i>F. nubica</i> para as drogas inibidoras da via da calcineurina.....	44
Avaliação da interferência da melanina na resistência de <i>Fonsecaea</i> sp. a FK506 e Ciclosporina A	48

Interação entre as drogas FK506 e Itraconazol e Anfotericina B para <i>F. pedrosoi</i> , <i>F. monophora</i> e <i>F. nubica</i>	52
Interação entre as drogas Ciclosporina A e Anfotericina B e Itraconazol para <i>F. pedrosoi</i> , <i>F. monophora</i> e <i>F. nubica</i>	61
5. Conclusões e perspectivas	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. Introdução

1.1 Cromoblastomicose

As infecções fúngicas atualmente estão mais presentes na sociedade, fato esse que não era comum há pouco tempo e começou a ter importância devido ao acometimento tanto de pessoas híginas como suscetíveis (Rodrigues *et al*, 2020). A medicina progrediu e junto dela diversos tipos de tratamentos e curas foram desenvolvidos para ajudar na sobrevivência de diversos grupos de pacientes. Ironicamente a quantidade de pessoas em risco de contrair infecções fúngicas aumentou (Köhler *et al* 2017). A utilização de drogas imunossupressoras e a persistência da epidemia da AIDS, acontecimentos que deixam os pacientes com sistema imune deprimido, intensificaram a quantidade de pessoas que adquirem infecções fúngicas invasivas (Dellièrre *et al*, 2020).

As infecções invasivas, as que são causadas por fungos, proporcionam um impacto significativo na saúde da população. Segundo a *Global Action Fund for Fungal Infections* (GAFFI) é estimado que, por ano, mais de um milhão de pessoas percam a visão como consequência da ceratite fúngica, mais de 300 milhões de pessoas de todas as idades sofrem com alguma infecção severa, causada por fungo, em todo o mundo e destes, cerca de 1,5 milhões de indivíduos devem vir a óbito (Rodrigues *et al*, 2020).

As infecções mais frequentes que acometem a população são causadas por *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp., *Candida* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., entretanto, espécies de fungos incomuns estão emergindo e causando mais doenças em pessoas que possam estar susceptíveis em decorrência de um sistema imune debilitado. Pode-se citar *Actinomucor elegans* uma espécie da ordem Mucorales e *Trametes polyzona*, basidiomiceto da ordem Polyporales (Dellièrre *et al*, 2020).

Entre os ascomicetos, várias espécies são capazes de desenvolver infecções fúngicas (Köhler *et al*, 2017). Dentro deste filo é encontrado um grupo de fungos que causam micoses cutâneas e subcutâneas conhecidas como cromoblastomicose (CBM) em hospedeiros saudáveis através de sua inoculação traumática (Rudolph, M. 1914). A doença cromoblastomicose foi estudada pela primeira vez em 1911 em São Paulo por Pedroso e Gomes que observaram quadro de dermatite verrucosa em quatro pacientes brasileiros (Martinez e Tovar. 2007; Queiroz-Telles *et al*, 2016) e em 1914 ela foi descrita oficialmente por Maximilliano Willibaldo Rudolph em um artigo alemão intitulado “Sobre a figueira brasileira”. Ele trabalhava como clínico em um hospital de Minas Gerais e identificou seis pacientes com lesões nos membros inferiores popularmente conhecida como “figueira”. Porém, o termo cromoblastomicose só foi cunhado

em 1922 por Terra e colaboradores (Queiroz-Telles *et al* 2016; Martinez, Tovar 2007; Torres-Guerrero *et al*, 2012).

Em 2017 a organização mundial da saúde incluiu a CBM como doença tropical negligenciada (DTNs), pois de acordo com a OMS os indivíduos mais acometidos por essas doenças são os que possuem baixo poder aquisitivo, moradores de zonas rurais remotas, periferias urbanas e zonas de conflito (Queiroz-Telles *et al*, 2017). As DTNs constituem um grupo de infecções tropicais e subtropicais endêmicas em populações de baixa renda que vivem em regiões como a África, Ásia e América Latina (Andrade *et al*, 2019).

A CBM pode ser definida como uma infecção fúngica crônica cutânea e subcutânea resultante da implantação de fungos demáceos dentro da pele que se desenvolvem em um tipo celular parasitário denominado células ou corpos muriformes (Najafzadeh *et al*, 2009; Krzysciak *et al*, 2014). Os agentes etiológicos são saprofíticos, encontrados em solos e na vegetação, os principais acometidos pela doença são trabalhadores rurais do sexo masculino que se contaminam com algum instrumento de trabalho ou com a própria vegetação (Khan *et al*, 2015).

Os fungos demáceos causadores da CBM pertencem a ordem *Chaetothyriales*, família *Herpotrichiellaceae*, incluindo: *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea monophora*, *Cladophialophora carrionii*, *Fonsecaea nubica*, *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquaspersa*, *Cladophialophora samoensi*, sendo 90% dos casos atribuídos ao *F. pedrosoi* (Britto; Bittencourt, 2018).

Apesar da CBM acometer indivíduos ao redor do mundo inteiro ela tem maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais da América Latina, Caribe, África e Ásia (**Figura 1**). O seu principal local de incidência no Brasil é a região amazônica (Ameen, 2008), porém como não há necessidade de notificação compulsória, por ser uma doença negligenciada, uma estimativa real do número dos casos da doença é dificultada (Queiroz-Telles, 2015).

Apesar das feridas serem localizadas, elas podem se desenvolver em lesões satélites (outras áreas do corpo), pela auto inoculação depois do paciente ter coçado a lesão inicial ou pela disseminação linfática (Khan *et al*, 2015).



Figura 2. Tipos de lesões de cromoblastomicose. Lesão ulcerativa papulosa no joelho após seis meses de evolução (A). Lesões nodulares na perna (B). Lesão verrucosa no pé (C). Lesão tipo placa no ombro (D). Diferentes tipos de lesões compostas por tipo placa, nodular e verrucosa envolvendo a perna (E). Lesões pseudo-vacuolar envolvendo a mão e antebraço (F) Lesão cicatricial no joelho e perna (G). Lesões tumorais na coxa e joelho (H). Lesão ecmatosa na mão e punho (I) (Reproduzido de Queiroz-Telles, 2013).

O diagnóstico laboratorial é feito pela histopatologia e cultura para identificar o patógeno causador. A coloração de Fontana-Masson para melanina é necessária para a confirmação dos corpos escleróticos ou células muriformes, que são patognomônicos da CBM (Figura 3A/B/C) (Manual MSD, 2020).

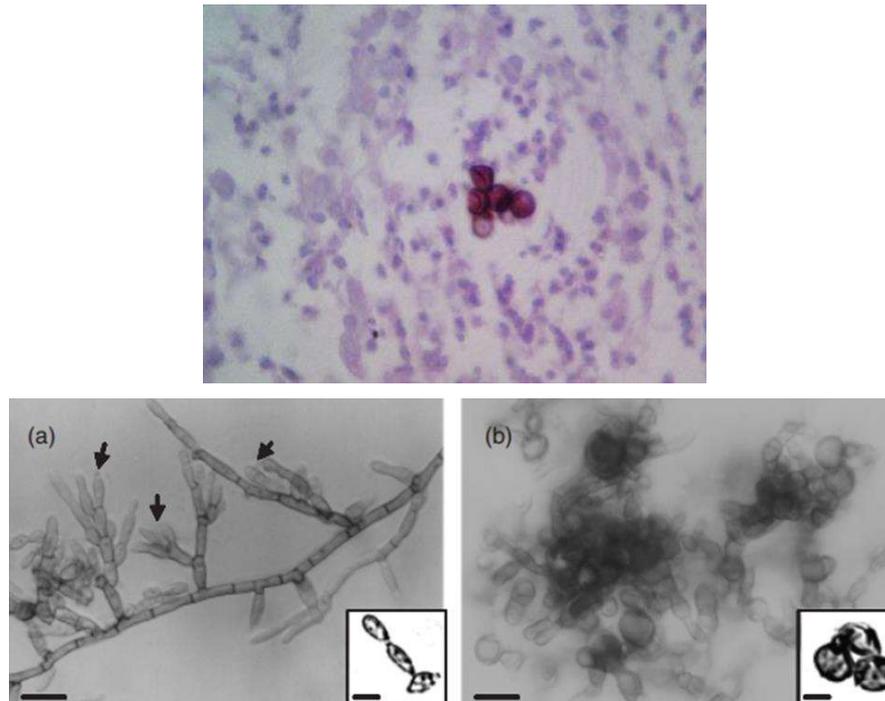


Figura 3A. Células muriformes ou escleróticas, achado patognomônico da CBM (coloração de hematoxilina e eosina, aumento de 40×) **3B/C.** Hifas de *F. pedrosoi* e células muriformes observados em microscópio de luz (Torres-Guerrero *et al*, 2012) (Santos *et al*, 2007)

1.2 Gênero *Fonsecaea*

Todas as espécies do gênero *Fonsecaea* produzem colônias enegrecidas aveludadas e células muriformes o que torna difícil a sua classificação, sendo possível identificá-las através de biologia molecular pela amplificação de regiões polimórficas (Queiroz-Telles *et al*, 2017). Morfologicamente esse gênero é definido pela presença de conidióforos melanizados com conídios de diferentes tamanhos, isolados ou em cadeias curtas que se ramificam (De Hoog *et al*, 2004). Estudos moleculares recentes demonstraram que o gênero *Fonsecaea* compreende quatro espécies clinicamente crípticas: *F. pedrosoi*, *F. nubica*, *F. monophora* e *F. pugnacios* e quatro espécies ambientais, *F. minima*, *F. erecta*, *F. brasiliensis* e *F. multimorphosa* (**Figura 4**) (Chen *et al*, 2016).

F. pedrosoi é o considerado o principal agente causador da CBM, apesar de ser um fungo com distribuição mundial está mais presente em regiões tropicais (Silva *et al*, 2007). É um microrganismo saprófita, seu nicho natural compreende o solo, madeira podre e plantas em decomposição (Santos *et al*, 2007). Considerado um fungo polimórfico, com uma fase saprofítica no solo, no qual está sob forma de micélios que produzem conídios e uma fase parasitária, onde encontra-se na forma de células muriformes (Alviano *et al*, 2003).

Nos últimos anos apesar do desenvolvimento de protocolos experimentais para obtenção de células muriformes *in vitro* utilizando propranolol ou fator ativador de plaquetas (PAF) (Chao, Olsen, 1993; Alviano *et al*, 1992), os mecanismos envolvidos na transição morfológica do fungo *F. pedrosoi* continuam desconhecidos (Santos *et al*, 2007).

Um estudo validado por Silva e seu grupo (2002), demonstrou que as células muriformes obtidas em laboratório utilizando meio de cultura natural à base de cupuaçu, são antigenicamente e morfológicamente similares as obtidas *in vivo*. Um fato documentado por Mendoza e colaboradores (1993) foi de que *F. pedrosoi* necessita de baixas concentrações de íon cálcio, no pH 2,5 para diferenciar de micélio para célula muriforme, sugerindo que a concentração desse íon em tecidos humanos pode participar do processo de transformação do fungo durante a CMB.

Assim como *F. pedrosoi*, *F. monophora* também é agente etiológico da CBM e o mais prevalente na região Sul da China (Yi *et al*, 2017). Foi demonstrada a sua relação causal com alguns casos de feohifomicoses, micoses sistêmicas oportunistas (Doymaz *et al*, 2014). *F. monophora* possui neurotropismo, tendo disseminação para o cérebro e outros órgãos. Além disto pode causar infecção cerebral primária sem lesões cutâneas (Queiroz-Telles *et al*, 2017). Dessa forma, seu potencial invasivo já foi descrito (Schneider *et al*, 2019). Acredita-se que há diferenças entre a patogênese e virulência das espécies *F. pedrosoi* e *F. monophora*, porém, devido à dificuldade de diferenciar morfológicamente os agentes etiológicos, necessita-se de mais estudos para detectar as particularidades de cada espécie. (Schneider *et al*, 2019).

Descrita pela primeira vez em 2010 por Najafzadeh e colaboradores, *Fonsecaea nubica*, foi isolada em diferentes locais, como Brasil, China, África e França. As manifestações clínicas, achados histopatológicos, tratamento e prognóstico relacionados a esta espécie são escassos na literatura (You *et al*, 2019). Sabe-se que *F. nubica* está relacionada exclusivamente a lesões epiteliais, com quadro clínico mais parecido com *F. pedrosoi* do que aquele apresentado por *F. monophora* (Schneider *et al*, 2019).

Ainda dentro do gênero *Fonsecaea* causadores de CBM existe o *F. pugnacius* que possui neurotropismo eventualmente levando à disseminação para o cérebro e outros órgãos ou causando infecção primária cerebral sem gerar lesões na pele, característico de feohifomicose (Queiroz-Telles *et al*, 2017). Essa capacidade de ou apresentar-se em formas de hifas no cérebro ou em células muriformes no tecido cutâneo do mesmo hospedeiro classifica a clínica do *F. pugnacius* como exclusiva, sendo a única espécie que apresenta essa dualidade (Bombassaro *et al*, 2020).

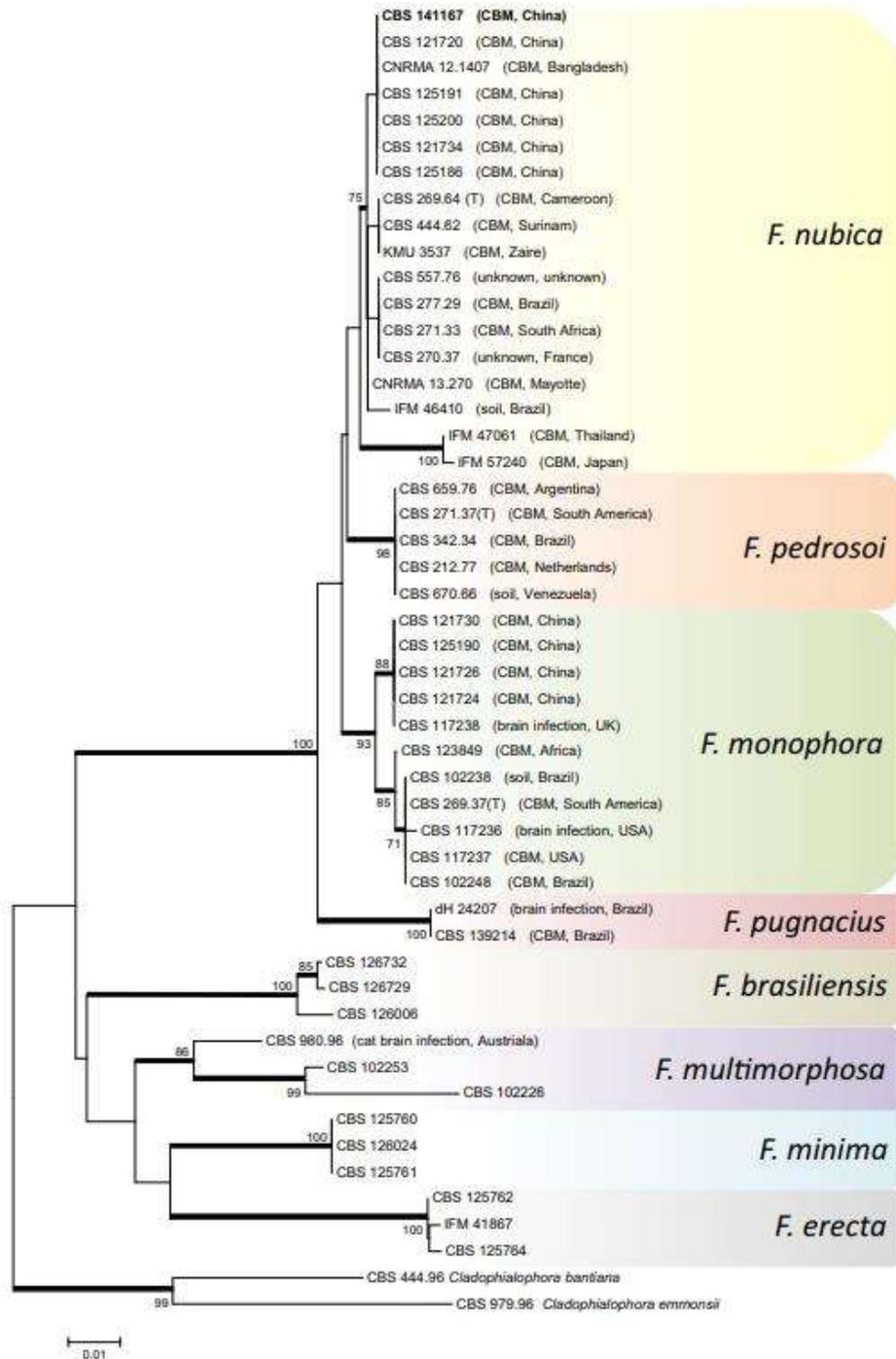


Figura 4. Árvore filogenética das espécies de *Fonsecaea* baseada em alinhamento de sequências (ITS) construída pelo método Neighbor joining utilizando o programa MEGA 6.0 (adaptado de Chen *et al*, 2016).

O sistema imune do hospedeiro é indispensável para a resposta contra o fungo, quando há uma alteração na homeostase do organismo e respostas anti- e pró- inflamatórias são geradas podendo favorecer o controle ou a cronificação da doença (Romani, 2011). Os humanos são naturalmente resistentes a maioria das infecções fúngicas e para o agente infeccioso gerar a doença ele deve ter quatro habilidades: crescer a 37°C; penetrar nos tecidos internos do hospedeiro; digerir ou absorver os componentes/ nutrientes dos tecidos humanos e resistir ao sistema imune do hospedeiro (Köhler *et al*, 2017).

Primeiramente ao entrar no organismo as células fúngicas são reconhecidas pelo sistema inato do organismo composto por células fagocitárias - macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. A partir desse reconhecimento dá-se o início da ativação e repressão de vias imunológicas com liberação de diferentes tipos de citocinas que são dependentes da severidade da doença. Sendo que é perceptível a resposta fungistática, ao invés de fungicida realizada pelos macrófagos ativados no hospedeiro (Queiros-Telles, 2017; Krzyściak *et al*, 2014).

De acordo com o estudo de Gimenes e colegas (2005), o perfil de citocinas liberadas depende da severidade da doença, que é determinada pelo tipo de resposta imune realizada pelo hospedeiro. Pacientes com formas severas da doença liberam mais interleucina-10 com inibição do IFN- γ resultando em baixa indução de proliferação de células T. Enquanto pacientes com forma de CBM mais branda apresentam aumento na produção de IFN- γ e baixa produção de interleucina-10, resultando em aumento na proliferação de células T. Em formas brandas predomina a resposta tipo Th1 nas severas Th2 enquanto nas moderadas há uma resposta intermediária entre Th1 e Th2 (Gimenes *et al*, 2010; Queiros-Telles *et al*, 2017).

Bocca e seu grupo (2020) demonstraram que a resposta do tipo Th17 também é fundamental no estágio inicial da doença CBM. As células Th17 secretam IL-17 que promove maturação e migração de neutrófilos para o local da infecção, conferindo proteção contra os patógenos enquanto o IFN- γ secretados por Th1 ativa os neutrófilos e aumenta a fagocitose dos fungos (Siqueira *et al*, 2020).

Fatores de virulência são importantes para a sobrevivência e reprodução do fungo, para o gênero *Fonsecaea* sp destacam-se a capacidade de dimorfismo para a forma de célula muriforme, a adesão celular, sua hidrofobicidade, termotolerância e a melanina (Queiroz-Telles *et al*, 2017). Essa última já foi bem descrita e é um fator de virulência fúngica importante pois possui propriedades anti-oxidativas, termoestáveis, anti-radioativas, paramagnéticas (Cunha *et al*, 2010; Pinto *et al*, 2018).

Dois tipos de melanina, são encontrados em *Fonsecaea sp*: a DHN-melanina e a DOPA-melanina, sendo a primeira expressa constitutivamente entre os membros deste gênero. Para os agentes patogênicos da CBM a DHN-melanina é sintetizada e se deposita na parede celular (Kohler *et al*, 2020). A melanina está envolvida na proteção do fungo contra fatores ambientais agressivos. É um composto imunologicamente ativo que auxilia o fungo a evadir à resposta imune do hospedeiro, promovendo resistência ao estresse oxidativo gerado durante a fagocitose.

Curiosamente, o seu potencial em reduzir a susceptibilidade de fungos melanizados a antifúngicos já foi descrito (Heidrich *et al*, 2021). O grupo de Xiao (2021) estudou o efeito da melanina na virulência do fungo *F. monophora*, eles fizeram um mutante knock-out para um dos genes envolvidos (*PSKA*) na via de síntese da melanina e verificaram que seu papel é primordial na esporulação, na taxa de crescimento, na sobrevivência em pHs extremos e na resistência antifúngica.

1.3 Tratamento

O tratamento da CBM pode ser realizado com a utilização de antifúngicos ou por outros procedimentos para tratar as lesões. Não há tratamento padrão, sendo necessário avaliar a situação do paciente assim como a extensão das lesões (Queiroz-Telles *et al*, 2009). No início da CBM as lesões respondem bem a cirurgias de remoção, mas com o aumento da gravidade, melhores resultados são alcançados com o uso sistêmico de antifúngicos (Queiroz-Telles *et al*, 2009). Assim, os tratamentos podem ser divididos em três tipos: físicos, quimioterápico e a terapia de combinação.

Dentre os tratamentos caracterizados como físicos, destacam-se as cirurgias, a terapia de calor e a criocirurgia. As cirurgias padrões com curetagem e eletrodissecação são indicadas a pacientes que possuem lesões pequenas com margens bem determinadas. São utilizadas para remover o tecido infectado. (Queiroz-Telles *et al*, 2009).

A terapia de calor, é a aplicação de aquecimento no local da lesão. A razão da escolha desse método é dada pelo fato do fungo *F. pedrosoi* (maioria das infecções) não crescer acima de 40°C e a pele suportar temperaturas de até 43°C sem sofrer danos. (Bonifaz *et al*, 2001).

Por fim, a criocirurgia é o uso de nitrogênio líquido para destruir lesões. Dos métodos físicos é a mais utilizada, apesar de possuir efeitos colaterais como dores, edemas, inclusive a ocorrência de infecção bacteriana. A disseminação de fungo foi documentada ao se utilizar a

criocirurgia isolada, sendo mais seguro o seu uso em conjunto com a quimioterapia para tratar pequenas lesões (Queiroz-Telles *et al*, 2009).

Outro tratamento que pode ser classificado como físico é a terapia fotodinâmica, que é um procedimento minimamente invasivo que possui como objetivo diminuir a atividade do patógeno. Constitui-se por um composto fotossensibilizador que é ativado ao entrar em contato com luz ultravioleta de baixa intensidade, ao ser ativado ele gera espécies reativas de oxigênio (ROS) e outras moléculas reativas, as quais conseguem prejudicar o sítio da infecção e ativam a apoptose nas células alvo. Esse tratamento foi testado em conjunto com drogas orais em pacientes com cromoblastomicose e resultados positivos foram vistos. Além disso, a terapia fotodinâmica já é utilizada em casos de cânceres e outras doenças infecciosas (Hu *et al*, 2019).

O caráter recalcitrante da doença torna a utilização da quimioterapia um desafio (Deng *et al*, 2018). As drogas amplamente utilizadas para o tratamento da CBM são anfotericina B (ANB), itraconazol (ITZ) e terbinafina (TBF) (Andrade *et al*, 2003).

A ANB é um antifúngico que tem como mecanismo de ação a formação de poros na membrana celular do fungo em altas concentrações. Ela liga-se ao ergosterol (principal componente da membrana celular fúngica) gerando poros que irão facilitar o efluxo de K^+ , inibe a glicólise e o efluxo de Mg^+ . Isso causa a acidificação do interior do fungo, conseqüentemente a sua morte (Hammil, 2013).

O obstáculo em relação a ANB é devido a sua neurotoxicidade, nefrotoxicidade, efeitos colaterais hematológicos e reações alérgicas. Devido ao tratamento para CBM ser longo a sua escolha não é indicada como primeira opção terapêutica (Deng *et al*, 2018). Mesa-Arango e colaboradores (2012) afirmam que apesar do mecanismo de formação de poros ser bem aceito na comunidade científica existem evidências de que apenas esse mecanismo não é eficaz para gerar a morte celular, o efeito de estresse oxidativo gerado pela droga é necessário para que ocorra a morte do patógeno. (Mesa-Arango *et al*, 2012).

Segundo Andrade *et al* (2018) os agentes da CBM não respondem bem ao tratamento com ANB, o que pode ser devido à baixa quantidade de ergosterol na membrana celular desses fungos. Além disso, como monoterapia ela possui um efeito não tão eficaz, porém, testes *in vivo* sugerem que ela possui efeito sinérgico ao ser combinada à 5-fluorocitosina (Britto, Bittencourt, 2018).

Itraconazol é um agente fungistático que age inibindo a síntese de ergosterol. A molécula de ITZ inibe a C14-ergosterol demetilase fúngica, que leva a diminuição da síntese de ergosterol, não conseguindo alterar a composição da membrana celular do fungo (Livertox,

2017). A dose de itraconazol recomendada é de 200 a 400 mg/dia, dependendo da gravidade da lesão (Queiroz-Telles *et al*, 2009). Foi demonstrado que o uso da droga em regimes de pulsoterapia (400 mg/dia durante uma semana no mês) possui resultado eficaz (Kumarasinghe, 2000). São raros os casos documentados de toxicidade ao ITZ e seu uso com outros métodos físicos ou em combinação com diferentes drogas possui um resultado eficaz no tratamento, o que torna o ITZ primeira linha de tratamento para CBM (Andrade *et al*, 2019).

Terbinafina é outro composto indicado como primeira linha no tratamento para CBM, possui um alto nível de tolerância e efetividade em pacientes (Deng *et al*, 2018). A terbinafina é uma droga que possui efeito fungicida, sua atividade está na inibição da esqualeno-epoxidase fúngica, que aumenta o esqualeno a níveis tóxicos, matando a célula (Livertox, 2018). A dosagem indicada é de 200 a 500 mg/dia e possui melhores efeitos com a dose mais alta (Queiroz-Telles, 2009).

Bonifaz e colaboradores (2001), relataram o tratamento eficaz de quatro pacientes com CBM, utilizando terbinafina na dose de 500 mg/dia. Outro estudo que comprovou o sucesso da TBF foi realizado por Esterre e colaboradores (2006) em 1996, que analisou 43 pacientes e a cura foi observada em 74,2% dos casos.

Não há um consenso sobre qual tratamento terapêutico usar, sendo a droga de escolha indicada o itraconazol seguido por terbinafina (Hellwig *et al*, 2018). Diversos autores acreditam que o tratamento mais adequado é feito pela utilização de altas doses de itraconazol e terbinafina durante 6-12 meses. Apesar de ter uma boa eficácia, alguns pacientes não respondem bem a esse tratamento (Andrade *et al*, 2019). Ainda, o tratamento depende do agente causador, severidade da lesão, estágio e recorrência da doença, sistema imune, tolerância e nível econômico do paciente (Andrade *et al*, 2019).

Andrade e colaboradores (2019), estudou 12 isolados clínicos causadores da CBM, sendo 8 deles da espécie de *F. pedrosoi*. Foi observado que itraconazol, voriconazol e terbinafina possuíram menores CIM em relação a outras drogas analisadas (5-fluorocitocina e anfotericina B), mas os pacientes tratados com itraconazol não apresentaram sucesso terapêutico. Fato esse que o grupo atribuiu a deficiência de absorção da droga pois os pacientes tinham baixo nível plasmático e baixa concentração da droga no tecido lesionado.

O procedimento cirúrgico pode disseminar o fungo para outros locais, assim a associação entre métodos físicos e quimioterápicos é indicada. O uso da criocirurgia com itraconazol possui um ótimo prognóstico, mais eficaz do que a combinação com terapia de calor (Queiroz-Telles, 2009). Utilização de duas drogas com alvos terapêuticos diferentes também

pode gerar bom resultado, exemplificando: a associação de terbinafina com itraconazol, ambas inibem a síntese de ergosterol, mas como os alvos moleculares são diferentes, obteve-se a melhora de pacientes com casos de CBM persistentes, ao alternar o uso dessas drogas (Gupta, 2002).

Em 2018, Coelho e colaboradores, avaliaram a combinação de drogas frente a diferentes isolados clínicos de pacientes com CBM causada por *Fonsecaea* sp. Foi observado que a combinação de anfotericina B com 5-fluorocitocina possuiu efeito sinérgico, porém devido ao seu caráter tóxico não é indicada para tratar doenças crônicas. Sendo sugerida para o caso de CBM severa em que há comprometimento do cérebro (Coelho *et al*, 2019).

Deng e colaboradores (2018), analisaram a associação de anfotericina B com terbinafina em 46 isolados clínicos de agentes causadores da CBM, observou-se que todos os isolados foram suscetíveis a combinação das drogas usadas, e, que essas apresentaram efeito sinérgico, com diminuição da CIM para anfotericina B. Sendo uma boa opção para pacientes que não respondem bem ao tratamento monoterápico com as drogas de primeira linha.

Outro estudo que verificou a existência de sinergismo entre drogas foi o da Biancalana e colaboradores (2011). Verificou-se as CIM para anfotericina B, itraconazol, terbinafina, voriconazol para fungos demáceos causadores de cromoblastomicose e feohifamicose e 96,5% dos isolados mostraram-se resistentes a anfotericina B. Ao examinar o efeito entre a combinação das drogas, encontrou-se sinergismo entre terbinafina e voriconazol, terbinafina e anfotericina B e terbinafina com itraconazol. O sinergismo pode ser atribuído ao fato da terbinafina e dos azóis possuírem mecanismos de ação diferentes. (Biancalana *et al*, 2011).

De acordo com alguns estudos, a melhor terapêutica seria a associação de dois antifúngicos para tratar CBM, baseado no teste de suscetibilidade *in vitro* (Coelho *et al*, 2018). Assim, a utilização de antifúngicos em associação, em situações onde não há resposta satisfatória à monoterapia ou a severidade da doença é alta, é uma alternativa para elevar a eficácia de cada droga e obter a cura com baixas doses, sem os efeitos colaterais indesejados (Deboit *et al*, 2013).

Como uma alternativa para tratamento da CBM, este trabalho avaliou a capacidade antifúngica de inibidores da via da calcineurina e sua associação a antifúngicos convencionais.

1.4 Via de sinalização da calcineurina

A calcineurina (Cna) é uma serina/treonina fosfatase dependente de cálcio e de calmodulina (Rusnak, Mertz, 2000). Ela é uma metaloenzima com um centro de metal binuclear

composto por íon ferro e zinco (Aramburu *et al*, 2001). É um heterodímero composto por duas subunidades, a catalítica (CnaA) e regulatória (CnaB) (Juvvadi *et al*, 2015).

Homólogos de calcineurina estão presentes em diferentes organismos, como parasitas, fungos, plantas, invertebrados e vertebrados superiores. É a única fosfatase reconhecida em fungos regulada por cálcio e calmodulina (CaM), com seu principal alvo o fator de transcrição Crz1, homólogo ao fator nuclear de células T ativadas (NFAT) em mamíferos (Juvvadi *et al*, 2015)

A sinalização ocorre a partir do estímulo gerado pelo íon cálcio de procedência intra ou extracelular, que faz com que a calmodulina se associe ao complexo da calcineurina, estimulando a sua ação de fosfatase e passando os sinais a vários fatores de transcrição (**Figura 5**) (Chen *et al*, 2010).

O único mecanismo bem entendido da calcineurina no controle da expressão de diferentes genes é pela defosforilação do fator de transcrição Crz1 (Juvvadi *et al*, 2015). A calcineurina é regulada *in vivo* pela quantidade intracelular de íons cálcio. Na célula em repouso a quantidade de cálcio é baixa, assim, a calcineurina não consegue se ligar na calmodulina. Quando há um aumento do nível de íon cálcio intracelular, ele se liga a CaM, gerando mudança conformacional, e dessa forma a CaM se liga à calcineurina e ativa a sua atividade de fosfatase, dando continuidade à cascata de sinalização (Rusnak e Mertz, 2019).

Segundo Juvvadi e colaboradores (2015) a via da Cna é importante na regulação de respostas ao estresse e crescimento em leveduras e fungos filamentosos, na virulência de vários fungos patogênicos humanos e de plantas.

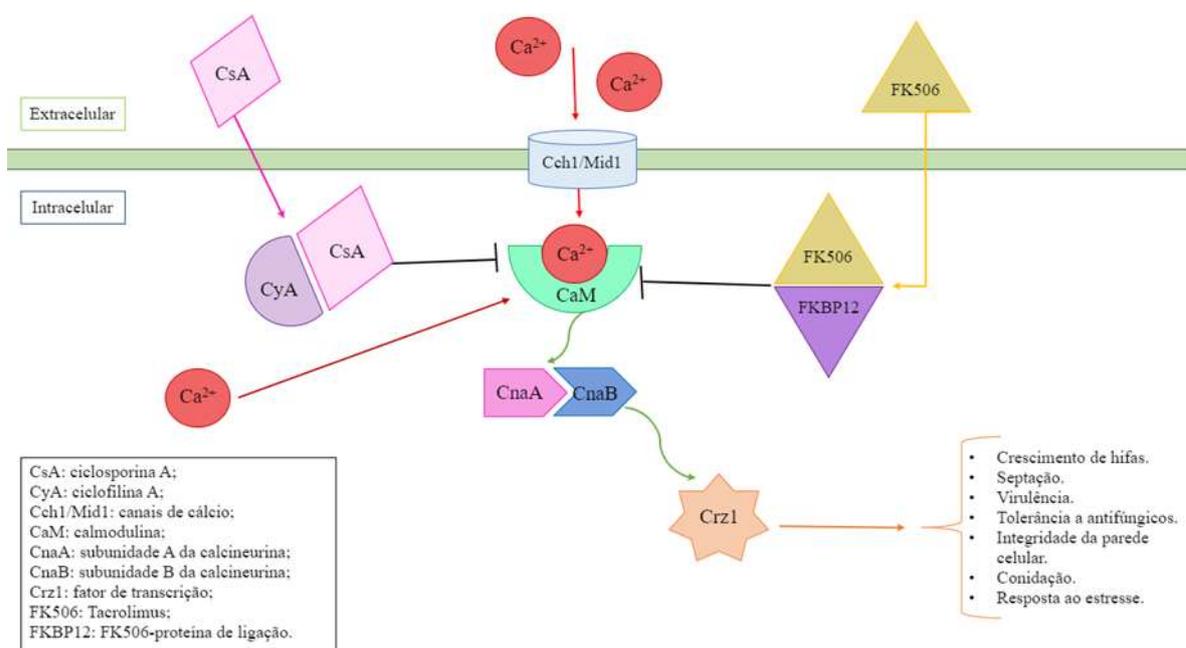


Figura 5. Via de sinalização da calcineurina. Representação da ativação da via da calcineurina. Íons de Ca^{2+} passam pelos canais de cálcio (Cch1/Mid1) do meio extracelular para o citoplasma, e juntamente com os íons já existentes no meio intracelular se ligam a proteína calmodulina (CaM) ativando-a e essa se liga à subunidade catalítica da calcineurina (CnaA) que se liga a subunidade regulatória da calcineurina (CnaB) formando o complexo ativado da Cna. O complexo é responsável por defosforilar e ativar o fator de transcrição (Crz1) que está relacionado com diferentes atividades no fungo. As drogas que inibem a via da calcineurina, FK506 (nome comercial Tacrolimus) e ciclosporina A (CsA) agem se ligando respectivamente a proteína de ligação de FK506 (FKBP12) e ciclofilina A (CyA) e esses complexos inibem a via da calcineurina (Fonte: elaborado pela autora, 2021).

A calcineurina foi bem estudada no modelo fúngico de *Saccharomyces cerevisiae* e em outros fungos causadores de doenças que possuem alto nível de mortalidade. Esses estudos mostraram que a Cna e as proteínas compreendidas nessa via de sinalização estão relacionadas com o crescimento do fungo e a patogenicidade (Chen *et al*, 2010). Alguns atributos de virulência que são regulados por esta via são a transição dimórfica, crescimento em temperatura corporal do hospedeiro, sobrevivência no soro e adesão ao tecido do hospedeiro (Chen *et al*, 2010).

Zhang e colaboradores em 2012, utilizando mutantes para a subunidade CnaB e para o fator de transcrição Crz1 de *Candida lusitanae*, demonstraram que a via é necessária para o crescimento da levedura no soro e em altas temperaturas e formação de pseudo-hifas. No mesmo estudo foi verificado que os mutantes para CnaB tiveram o crescimento interrompido na presença de equinocandinas e azóis, confirmando que Cna é necessária para a resistência a essas drogas (Zhang *et al*, 2012).

Ferreira e colaboradores (2007) observaram em *Aspergillus fumigatus*, um patógeno oportunista e um dos fungos mais estudados em relação à calcineurina, que o mutante para a subunidade catalítica apresenta defeitos severos associados ao crescimento e morfologia deste patógeno. Colônias do mutante eram menores e com aspecto ondulado, ao invés de liso. A morfologia das hifas vegetativas apresentou aumento na ramificação apical. Os esporos desse mutante possuem forma de lágrima, enquanto no selvagem possuem forma redonda. Observou-se que eles não eram capazes de crescer em meio contendo soro fetal bovino.

Outro grupo analisou o mutante para a subunidade catalítica A da calcineurina em *A. fumigatus*, foi observado que o mutante possui defeitos fisiológicos. A ausência de filamentação e o baixo crescimento radial foram muito influenciados pelo defeito da via da cna, houve pouco crescimento das hifas e encurtamento das suas pontas. A conidiogênese também foi influenciada, os conídios no tipo selvagem eram isolados enquanto os do mutante permaneceram conectados, em forma de cadeias (Steinbach *et al*, 2006).

Juvvadi e colaboradores (2011) analisaram a diferença entre os mutantes de *A. fumigatus* para a deleção da subunidade catalítica A (Δ cnaA), subunidade regulatória B (Δ cnaB) e para a deleção das duas subunidades (Δ cnaA Δ cnaB). Em relação ao crescimento radial da colônia, os mutantes simples apresentaram crescimento compacto, enquanto que o duplo mutante apresentou uma colônia levemente mais compacta que os anteriores. Além disso, o crescimento do duplo mutante foi mais lento do que os dos simples. A germinação do duplo mutante também foi alterada em comparação com os mutantes simples, os três mutantes apresentaram menos ramificações que o selvagem, o Δ cnaA apresentou ramificações curtas, enquanto o Δ cnaB e o Δ cnaA Δ cnaB possuíram ramificações mais alongadas. Essas observações sugerem que cada subunidade do complexo da Cna possui atividades importantes independentes (Juvvadi *et al*, 2011).

No fungo filamentosso *Arthroderma vanbreuseghemii*, causador de micose cutânea, Alshahni e colaboradores (2015) estudaram a inibição da Cna pela utilização de FK506 associada ao fluconazol e observaram defeitos no crescimento de acordo com o aumento da dose das drogas. O mutante com expressão diminuída de *cnaA* apresentou colônias menores a 28° C e incapacidade de produzir hifas a 37 °C. Ainda foi possível observar que houve diminuição da expressão de Hidrofobina A (responsável pela camada hidrofóbica do fungo), sugerindo que a CnaA está associada com a sua regulação (Alshahni *et al*, 2015).

O envolvimento da Cna no dimorfismo foi descrito para o fungo *Mucor circinelloides*, no qual a mutação ou inibição da Cna conferiu um fenótipo de levedura, que não consegue se transformar em hifa, indicando o papel dessa via na transição morfológica (Lee *et al*, 2015).

1.5 Via de sinalização da calcineurina como alvo terapêutico

Em mamíferos a Cna possui como alvo o fator de ativação de células T (NFAT), que controla funções biológicas essenciais nos sistemas imune, nervoso, vascular e endócrino (Chen *et al*, 2010). Já foram descritas que deficiências nessa via estão relacionadas com doenças como síndrome de Down, diabetes e hipertrofia cardíaca (Crabtree, Schreiber, 2009).

Existem inibidores da via da calcineurina que são bem documentados, aprovados pelas agências reguladoras para uso como drogas imunossupressoras em transplante de órgãos, para evitar a doença do enxerto versus hospedeiro, como é o caso da ciclosporina A (CsA) e tacrolimus (FK506) (Chen *et al*, 2010).

CsA é um decapeptídeo fúngico, isolado do ascomiceto *Tolyocladium inflatum*. Seu mecanismo de ação consiste em formar um complexo com seu ligante citoplasmático, a

ciclofilina A (CyA). Dessa forma, o complexo ciclosporina-ciclofilina inibe a atividade da Cna, causando o bloqueio do NFAT (Garcia *et al*, 2004).

FK506 é um antibiótico, da classe dos macrolídeos, derivado da bactéria *Streptomyces tsukubaensis*. Liga-se a imunofilina FK-binding protein isoenzyme 120 (FKBP-12), formando um complexo que também inibe a ação da Cna. Os resultados de modelos *in vitro* indicam que o FK506 possui um efeito imunossupressor mais potente que a CsA (Garcia *et al*, 2004).

A utilização de tacrolimus e ciclosporina A contra infecções fúngicas invasivas foi estudada, e estabeleceu-se o mecanismo de ação dos complexos que essas substâncias formam que inibem a atividade da Cna em fungos patogênicos (**Figura 5**). Porém, devido à reação cruzada com as células do hospedeiro, gerando efeitos imunossupressores, essas drogas não são indicadas como monoterapia para tratar infecções fúngicas (Juvvadi *et al*, 2015). No entanto, a utilização de CsA e FK506 junto com outras classes de antifúngicos apresentou efeitos sinérgicos, resultando na potencialização da ação fungicida (Lamoth *et al*, 2013).

Zhang e seu grupo (2012), utilizaram duas cepas de *Candida lusitanae* resistentes à equinocandina (caspofungina) e duas sensíveis, para avaliar o efeito de FK506 associado à caspofungina e constataram que houve efeito sinérgico entre as duas drogas para os dois tipos de cepas utilizadas. O sinergismo entre os inibidores de cna com outras drogas também foi documentado na formação de biofilmes de *Candida albicans*, *Aspergillus spp.*, e *Exophiala dermatidis* (Gao *et al*, 2017).

Kotoyannis e colaboradores em 2007, avaliaram o efeito sinérgico entre os inibidores de Cna com fluconazol e anfotericina B em isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* em paciente em tratamento para criptococose após transplante de órgãos. Constatou-se que 90% dos isolados apresentaram efeito sinérgico, e pacientes que estavam em tratamento para criptococose com inibidores de Cna tiveram um aumento na sobrevida em comparação com aqueles que não estavam sendo tratados com esses inibidores.

Li e colaboradores (2008), observaram o sinergismo entre Ciclosporina A com três azóis diferentes (itraconazol, fluconazol e voriconazol) em linhagens de *Candida albicans* resistente a azóis. Além disso, as concentrações das drogas quando utilizadas em combinação são menores do que quando usadas sozinhas, o que corrobora com a possibilidade de baixas doses serem aplicadas para tratamento de infecções fúngicas.

Shirazi e Kontoyiannis (2013) demonstraram que existe sinergismo entre FK506 e drogas que possuem como alvo terapêutico o ergosterol (itraconazol e posiconazol) presente na parede celular de fungos causadores de mucormicose (*Rhizopus oryzae*, *Cunninghamella*

bertholletiae, e *Mucor circinelloides*). Ao adicionarem o inibidor da via de Cna com o composto azólico houve diminuição no CI

M. Além disso, foi observado que o azol teve efeito fungicida ao invés do fungistático quando utilizado com o FK506. Esse efeito foi atribuído à apoptose, induzida pelo acúmulo intracelular de Ca^{2+} , aumento de espécies reativas de oxigênio e alteração no potencial mitocondrial, devido ao uso das duas drogas (Shirazi e Kontoyiannis, 2013).

Apesar de ser uma estratégia interessante, a utilização inibidores da via da Cna com antifúngicos deve ser vista com cautela em relação à concentração das drogas inibidoras da via da calcineurina devido ao seu potencial imunossupressor. Tentando contornar essa situação e usufruir da capacidade antifúngica de drogas bloqueadoras dessa via, pesquisadores propuseram, sintetizaram e testaram moléculas análogas de FK506 com afinidade específica para a FKBP de fungos (Lee *et al*, 2018).

Um estudo realizado por Odon e colaboradores em 1997 testou a utilização de um análogo a FK506 que não possuía atividade imunossupressora contra *C. neoformans* e observaram que essa molécula era tóxica para o mesmo, sugerindo o seu potencial como droga antifúngica. Lee e colaboradores (2018) testaram a atividade antifúngica de quatro diferentes análogos a FK506 contra *C. neoformans*, *C. albicans* e *A. fumigatus*, além disto avaliaram a capacidade de imunossupressão, citotoxicidade e efeito sinérgico com outras drogas antifúngicas. Como resultado obtiveram um composto promissor para servir como alternativa ao arsenal terapêutico para tratamento das infecções fúngicas.

Justificativa

A cromoblastomicose é uma doença tropical negligenciada que atinge principalmente trabalhadores rurais, não existe um tratamento padrão para tratar essa doença e diversas vezes os agentes patogênicos não respondem bem às drogas conhecidas e amplamente utilizadas. Novas abordagens terapêuticas são uma demanda urgente visto que há a necessidade de melhorar a vida dos pacientes que sofrem com essa doença recalcitrante de difícil cura. Diante do exposto o atual trabalho baseia-se na necessidade de desenvolvimento de novas estratégias quimioterápicas para o tratamento contra a cromoblastomicose. Dessa forma o trabalho se propões a avaliar a ação entre drogas inibidoras da via da calcineurina atuando em conjunto com antifúngicos comumente utilizados na rotina terapêutica e verificar o tipo de interação entre elas contra a viabilidade de três espécies do gênero *Fonsecaea* sp.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho possui como objetivo geral avaliar a atividade antimicrobiana dos inibidores da via da calcineurina FK506, nome comercial Tacrolimus, e Ciclosporina A em fungos patogênicos humanos do gênero *Fonsecaea* sp. causadores da doença cromoblastomicose.

2.2 Objetivos específicos

1. Realizar o levantamento na literatura da metodologia utilizada para determinação dos testes de concentração inibitória mínima (CIM) em fungos do gênero *Fonsecaea*.
2. Padronizar o ensaio para determinação de CIM e *checkerboard* e o teste de viabilidade celular.
3. Determinar a concentração mínima inibitória para as três espécies (*F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica*) das drogas inibidoras da via da calcineurina: Ciclosporina A e FK506 assim como para antifúngicos utilizados: anfotericina B, fluconazol e itraconazol.
4. Determinar se há efeito combinado entre antifúngicos e inibidores da via da calcineurina para as três espécies de fungos utilizadas. Identificar qual é o efeito entre as drogas combinadas.

3. Materiais e Métodos

3.1 Condições de cultivo e manutenção das linhagens de *Fonsecaea*

As linhagens do gênero *Fonsecaea* utilizadas para a realização dos experimentos foram, *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea monophora* e *Fonsecaea nubica* gentilmente doados por Vânia Aparecida Vicente (UFPR- PR), Luciana Trilles (Fiocruz – RJ), e Márcia Melhem (Instituto Adolfo Lutz – SP), respectivamente. A cepa de *Cryptococcus neoformans* utilizada foi H99, gentilmente cedida Por Dr. Andrew Alspaugh (Duke University, EUA). Os fungos são mantidos em alíquotas de glicerol 25% no freezer a -80°C como estoque, e quando há a necessidade são retiradas para fazer o cultivo em meio batata dextrose e meio Sabouraud dextrose a 28°C por 7 a 14 dias. Para a realização de cultivo em meio líquido, a agitação é de 150 rpm. A purificação dos conídios isolados fúngicos foi realizada por filtração através de lã de vidro com solução

salina 0,9%. Após a purificação os conídios eram lavados uma vez com solução salina, e coletados por centrifugação a 4000 rpm por 5 min para posterior utilização nos ensaios.

3.2 Meios de cultura e soluções

Meio batata dextrose – PDA, para 1L:

100 g batata descascada picada;

Dextrose 1%

Água destilada

pH: 5.6

25 µg/mL Cloranfenicol

Esterilização a 120°C por 15 min;

Para meio sólido há adição de 1,5% de ágar.

Cozinhar a batata picada em água destilada durante trinta minutos em microondas na potência 7. Filtrar o caldo da batata em um novo recipiente e adicionar a dextrose 1%. Ajustar o pH para 5,6. Adicionar 25 µg/mL de Cloranfenicol.

Meio Sabouraud

Peptona 1%

Dextrose 4%

Água destilada

pH: 5.6

Esterilização a 120°C por 15 min;

Solução salina 0,9%

Cloreto de sódio 0,9%

Água destilada

Esterilização a 120°C por 15 min;

Adicionar cloreto de sódio 0.9% em água destilada, misturar até completa dissolução.

Meio RPMI 1640 modificado para 1L

RPMI 1640 10,4 g

Glicose 2%

NaMOPS 17,26 g

pH: 7

Esterilização por filtração em membranas do tipo millipore 0,22 µm.

Resazurina 0,02%

Sal de sódio de Resazurina

Água destilada

Adicionar 0,02g de sal de sódio de Resazurina em 100mL de água destilada e misturar até completa dissolução;

Esterilizar por filtração em membrana millipore 0,22 µm.

3.2 Revisão bibliográfica

A fim de se obter os parâmetros e condições mais comumente utilizados para os ensaios de determinação da atividade antimicrobiana dos antifúngicos foi realizada uma revisão literária. Foi realizado levantamento de dados na plataforma de busca: *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), através das palavras-chave, tanto em português como em inglês: *Fonsecaea* sp, Cromoblastomicose, determinação de atividade antimicrobiana, antifúngicos, concentração inibitória mínima (CIM) e índice de determinação de concentração fracionada (FICI).

3.3 Determinação da concentração mínima inibitória (CIM)

Para avaliar o efeito em *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica* do bloqueio farmacológico da via de calcineurina pelo uso dos inibidores FK-506 e ciclosporina A, foi realizada a padronização do ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) com a Anfotericina B (ANB). CIM é definida como a menor concentração da droga com capacidade para inibir o crescimento visível do microrganismo (Hellwig *et al*, 2019).

O protocolo utilizado para a padronização é o **EUCAST - EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3** (EUCAST, 2020). A suspensão de conídios de concentração de 4×10^5 /mL é utilizada para o teste, no qual, em uma placa de 96 poços de fundo chato são adicionados o meio RPMI 1640 (utilizou-se RPMI 1640 da empresa Sigma com suplementação de glicose 2% e MOPS- ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico com concentração final de 0,165 mol/L) com pH 7, o fármaco (Anfotericina B) e a suspensão de conídios feita em RPMI 1640. As drogas a serem utilizadas devem ser preparadas 2× a concentração final para que por poço seja de 1×, os compostos utilizados nesse trabalho que se encontravam liofilizados foram

diluídos em DMSO para a solução estoque e solução de uso. Com o mesmo intuito a suspensão de conídios é produzida na concentração de 4×10^5 /mL para que no final esteja em 2×10^5 /mL. Em cada poço há a adição de 100 μ L de RPMI 1640, 100 μ L da suspensão fúngica (4×10^5 /mL) e a droga que é diluída de maneira seriada entre os poços.

As concentrações de Anfotericina B utilizadas foram 16 a 0,06 μ g/mL. Nos dois últimos poços estão o controle positivo de crescimento (suspensão fúngica com o meio RPMI 1640) e o negativo de contaminação (apenas o meio RPMI 1640).

O mesmo experimento foi realizado para outras drogas com os intervalos de concentração: 8 - 0,0625 μ g/mL para itraconazol, 32 – 1 μ g/mL para fluconazol, 64 – 0,5 μ g/mL para ciclosporina A e 64 - 0,5 μ g/mL para FK506. A **Tabela 1** indica as concentrações das soluções estoque utilizadas nos ensaios, bem como o diluente. O tempo de incubação foi de cinco dias a 35° C. Um esquema representativo do experimento está na **Figura 6**.

A leitura do teste foi feita visualmente e através de microscópio invertido para confirmar o crescimento do fungo em cada poço analisado. A CIM é definida pelo poço em que não houve crescimento na presença das drogas analisadas.

Ainda foi realizado o controle do inóculo para avaliar a quantidade de conídios utilizada no teste através do plaqueamento de 100 μ L da suspensão de conídios de 4×10^3 /mL (diluição 1:100) em ágar Sabouraud dextrose.

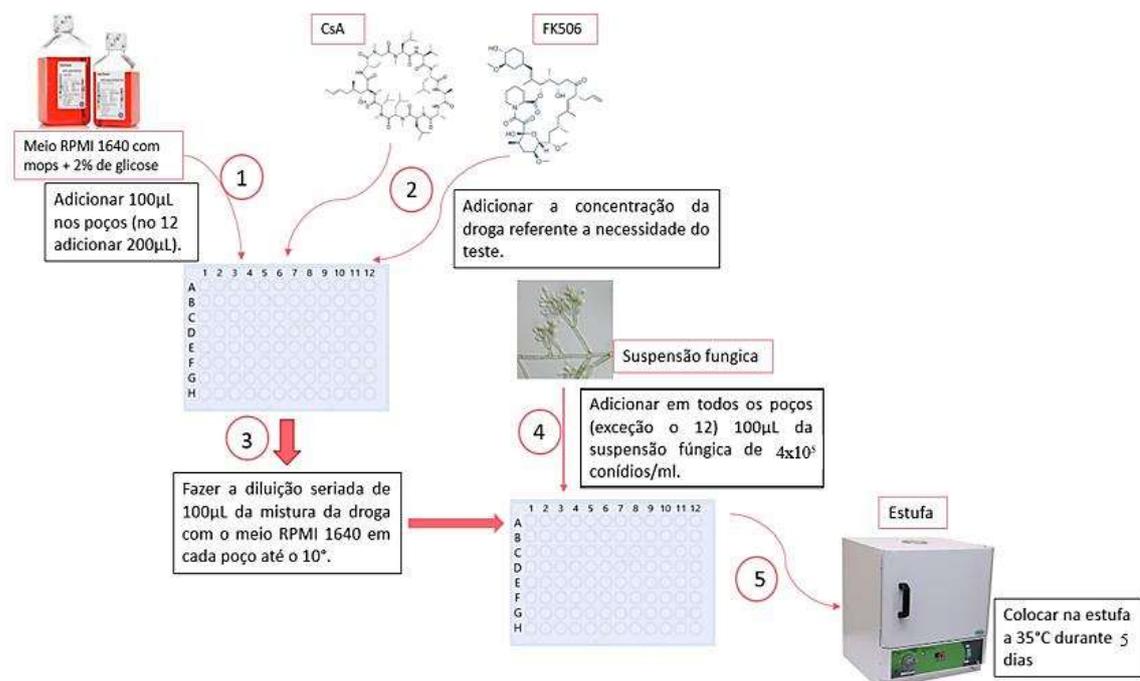


Figura 6. Esquema da metodologia utilizada para o ensaio de determinação da concentração mínima inibitória, segundo protocolo EUCAST - EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3.

Tabela 1. Soluções estoque das drogas utilizadas nos ensaios.

Droga	Diluição	Concentração da solução estoque
FK506	12,8 mg de FK506 liofilizada em 500 µL de DMSO.	25,6 mg/mL
Ciclosporina A	25 mg de Ciclosporina A liofilizada em 500 µL de DMSO.	50 mg/mL
Fluconazol	12,8 mg de Fluconazol liofilizado em 500 µL de DMSO.	25,6 mg/mL
Itraconazol	12,8 mg de Itraconazol liofilizado em 500 µL de DMSO.	25,6 mg/mL
Anfotericina B	Produto já vem diluído em água (marca Sigma, n. cat. A2942)	250 µg/mL

Como controle dos experimentos e atividade das drogas, foi determinada a susceptibilidade da cepa H99 do fungo *Cryptococcus neoformans* às drogas FK506, ciclosporina A e anfotericina B. O ensaio foi realizado segundo protocolo EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3.2 para leveduras em placa de 96 poços. A concentração final de leveduras por poço foi de 2×10^5 /mL. A placa foi incubada a 35°C por 48h e a identificação das CIMs foi definida por inspeção visual.

3.4 Ensaio para determinação da concentração mínima inibitória com o inibidor de melanina – Triciclazol.

A fim de verificar se a presença de melanina afeta a susceptibilidade de *Fonsecaea* a FK506 e ciclosporina A, foi utilizado o triciclazol, um inibidor da síntese de DHN melanina que modifica a cor das colônias de verde escuro, preto ou cinza para marrom avermelhado devido ao acúmulo de metabólitos intermediários da via de biossíntese de DHN melanina (Heidrich *et al*, 2021). Inicialmente foi realizado o ensaio de susceptibilidade ao triciclazol em concentrações que variaram de 500 a 1,95 µg/mL, segundo protocolo EUCAST, para o isolado de *F. pedrosoi*. Após a determinação da CIM e da concentração mínima que promove inibição da síntese de melanina, foi avaliada a CIM para FK506 e ciclosporina A para os três gêneros de

Fonsecaea sp. utilizados nesse estudo, com modificações do protocolo determinado por Heidrich *et al.*, 2021.

Os inóculos dos fungos foram feitos em meio batata dextrose líquido com e sem a presença de triciclazol na concentração de 4 µg/mL (dissolvido em álcool absoluto). A cultura foi incubada por 10 dias a 28° C, 170 rpm para obtenção dos conídios. A inibição da melanina foi verificada pela alteração da cor do sobrenadante do meio de cultura. Após 10 dias os inóculos foram filtrados, os conídios purificados e utilizados nos ensaios de susceptibilidade aos inibidores da via da calcineurina e de itraconazol (**Figura 7**). As concentrações das drogas estão indicadas na **Figura 7**. O teste de susceptibilidade foi realizado em quatro condições diferentes:

- 1) cultura crescida em meio batata dextrose com triciclazol (4 µg/mL) e adição de triciclazol (4 µg/mL) no meio RPMI 1640 utilizado para o ensaio;
- 2) cultura crescida em meio batata dextrose com triciclazol (4 µg/mL) -;
- 3) cultura crescida em meio batata dextrose sem adição de triciclazol mais triciclazol (4 µg/mL) adicionado no meio RPMI 1640 utilizado para o ensaio
- 4) cultura crescida em meio batata dextrose sem adição de triciclazol;

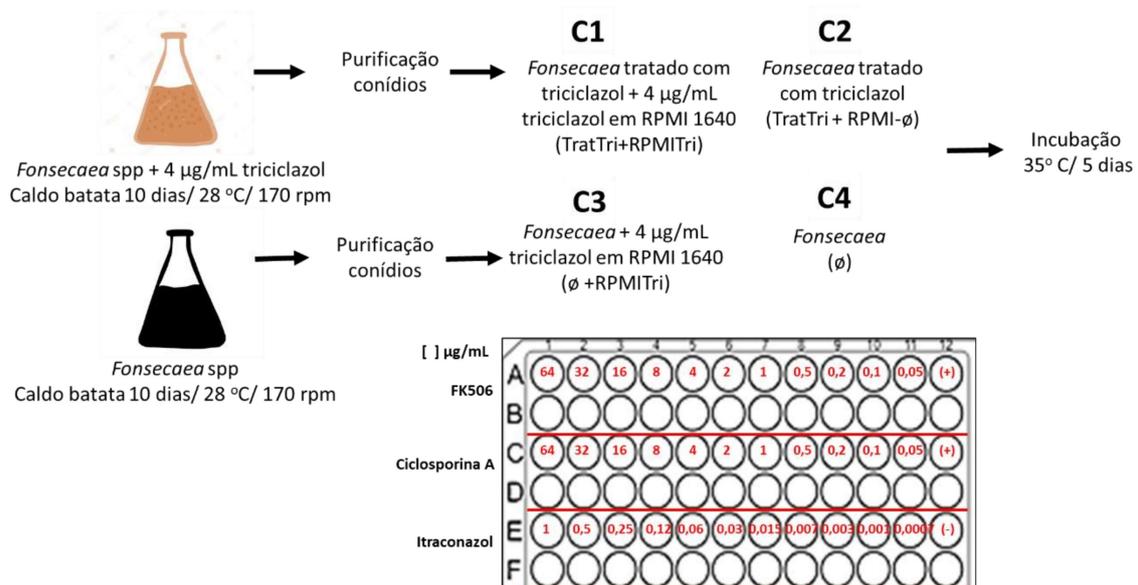


Figura 7. Fluxograma do ensaio para determinação da CIM na presença do inibidor de melanina – triciclazol. Nas linhas A/B foi realizado o teste com FK506, C/D com a Ciclosporina A e em E/F com a droga antifúngica itraconazol. Na coluna 12 encontram-se os controles, em 12A/B controle de crescimento positivo, 12C/D controle de crescimento com DMSO 1% e em 12E/F controle de negativo de contaminação.

3.5 Teste de interação entre as drogas - ensaio de Checkerboard

Para verificar se existe interação entre as drogas bloqueadoras da via da calcineurina (FK506 e CsA) com drogas antifúngicas convencionais Anfotericina B e Itraconazol, foi realizado o teste de *checkerboard* pelo qual é observado o índice concentração inibitória fracional – FICI, que mede as combinações entre as drogas e através de um cálculo ($FICI = (CIM \text{ droga 1 na combinação} \div CIM \text{ droga 1 sozinha}) + (CIM \text{ droga 2 na combinação} \div CIM \text{ droga 2 sozinha})$) consegue-se afirmar o tipo de relação que há entre elas (**Tabela 2**) (Arikan *et al*, 2002).

Tabela 2. Relação entre os valores de FICI e o efeito da combinação das drogas (Arikan, *et al*, 2002).

Valor	Efeito
$\leq 0,5$	Sinergismo
$0,5 < FICI \leq 1,0$	Efeito aditivo
$1,0 < FICI \leq 4,0$	Sem interação
$> 4,0$	Antagonismo

Para a execução do experimento uma placa de 96 poços foi utilizada, na qual diferentes concentrações das drogas são adicionadas em diversas combinações. Dessa forma é possível determinar em qual combinação ocorreu a inibição do crescimento, encontrando o índice de concentração inibitória fracional e o efeito das drogas em conjunto.

O procedimento é feito a partir do ensaio de susceptibilidade às drogas. Foram determinadas as CIMs das drogas, FK506, Anfotericina B, Itraconazol e Ciclosporina A em testes isolados para as linhagens de *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica*. Após esse teste foi montada a placa para o ensaio de *checkerboard*, de acordo com a **Figura 8**.

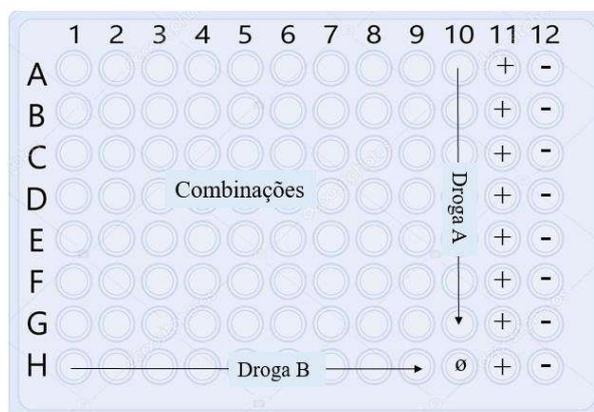


Figura 8. Esquema da placa utilizada para o ensaio de *checkerboard*. Nas colunas encontra-se uma das duas drogas inibidoras da via da calcineurina (exceção colunas 11 e 12) enquanto nas linhas encontra-se o antifúngico, assim nas diagonais estão as combinações das duas drogas utilizadas no teste.

Na linha A, a concentração final da droga A (FK506 ou Ciclosporina A) foi de 64 µg/mL, 32 µg/mL na linha B e assim por diante até chegar na concentração de 1 µg/mL da droga A, na linha G.

A droga B (itraconazol ou anfotericina B) foi adicionada à placa da seguinte forma: em toda a coluna 1 a concentração final da droga B foi 4 µg/mL, 2 µg/mL em toda a coluna 2 e assim por diante até chegar na concentração 0,01 µg/mL da droga B, na coluna 9. Dessa forma foi realizada a combinação entre diferentes concentrações das duas drogas entre 1A e 9G, enquanto a coluna 10 e a linha H estão apenas as drogas sozinhas para a determinação do CIM.

Em todos os poços da coluna 11 foram adicionados apenas conídios em RPMI (2×10^4 /mL de concentração final) como controle positivo e à coluna 12 foram adicionados 200 µL de RPMI (controle negativo de crescimento).

As placas foram incubadas a 35°C por 5 dias. No penúltimo dia de incubação (96h) foram adicionados 20µL de resazurina a 0,02% (concentração de uso) em todos os poços e incubou-se novamente por mais um dia na mesma temperatura. Realizou-se a inspeção visual e a leitura em espectrofotômetro para microplaca Epoch em dois comprimentos de ondas diferentes (570 e 600 nm). Após essa inspeção foi feito o cálculo para identificar o tipo de interação existente entre as drogas (FICI) e a viabilidade das células de acordo com a porcentagem de redução da resazurina.

A resazurina é um indicador de oxido-redução utilizado para determinar a viabilidade de células eucarióticas. A coloração não-fluorescente azul é convertida em rosa extremamente fluorescente chamado de resorufina. A resazurina inicialmente era comercializada com o nome de AlamarBlue™, mas hoje em dia está disponível sob outros nomes, o pó de sal sódico de resazurina que é mais favorável economicamente para detectar a atividade antifúngica do que o mesmo composto com nomes comerciais (Monteiro *et al*, 2012).

Realizou-se o cálculo de porcentagem de redução do composto analisado. A leitura da absorbância de cada poço foi feita em 570 nm (excitação) e 600 nm (emissão) e utilizou-se a expressão para calcular a porcentagem de redução da resazurina de cada poço: $\% \text{ red} = \frac{A_{570} - (A_{600} \times R_0)}{A_{600} - (A_{600} \times R_0)} \times 100$, onde A_{570} é a absorção a 570 nm do poço teste e A_{600} é a absorção a 600 nm do poço teste e R_0 é a razão entre A_{570} e A_{600} do poço controle negativo (branco). Para calcular a % de redução da resazurina em relação ao controle positivo foi utilizada a seguinte fórmula: $\% \text{ em relação ao controle do teste} = 100 \times \frac{\% \text{ redução poço teste}}{\% \text{ redução poço controle}}$.

O programa Combenefit (Veroli *et al.*, 2016) foi utilizado para avaliação da interação entre as drogas testadas baseando-se no modelo de interação independente de Bliss, esse modelo é realizado pela medida do desvio da superfície indicando se os efeitos dos compostos são independentes. A probabilidade de a célula estudada, a espécie fúngica, sobreviver a determinada dose da droga A (inibidor da via da cna) junto da dose da droga B (antifúngico) é o produto das probabilidades de que a célula sobreviveria se estivesse sob efeito de uma das drogas sozinha (Twarog *et al.*, 2020). O plano zero do gráfico indica interações independentes de Bliss enquanto valores acima de zero representam sinergia estatisticamente significativa (Veroli *et al.*, 2016). As porcentagens de redução de resazurina em relação ao controle foram plotadas para obtenção das matrizes de interação.

3.6 Microscopia Óptica

A inspeção do crescimento fúngico nos ensaios foi realizada por microscopia óptica. O crescimento fúngico de cada poço foi observado em objetiva de 20× do microscópio marca *Zeiss Axio Observer Z1* equipado com a câmera CCD. As fotos foram coletadas e analisadas utilizando o programa *Zen 3.4 blue edition*. Registraram-se fotos de todos os poços (exceção do controle negativo no qual não há crescimento) dos experimentos de *checkerboard* assim como os com triciclazol para os fungos *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica*. A utilização de microscópio óptico auxilia na verificação precisa do crescimento dos fungos, possibilitando a definição mais precisa da concentração mínima inibitória e da combinação na qual ocorreu interação entre as drogas.

4. Resultados e Discussão

Condições e parâmetros utilizados para a determinação da CIM em fungos causadores de Cromoblastomicose

Foi realizado um levantamento da literatura sobre ensaios para determinação de concentração mínima inibitória e os parâmetros utilizados a fim de identificar as melhores condições para os testes para os fungos do gênero *Fonsecaea* sp. Foram selecionados 17 artigos científicos, no entanto apenas 10 apresentaram descritos todos os parâmetros requeridos para a realização do ensaio de susceptibilidade aos antifúngicos. As informações coletadas dos 10 artigos foram tabuladas e foram comparados: país de origem do artigo, espécies de *Fonsecaea* testadas, drogas antifúngicas, meio de cultura utilizado, densidade final de conídio/mL, temperatura e tempo de incubação e o protocolo de referência utilizado. Os resultados desse levantamento encontram-se descritos na **Tabela 4**.

A maioria dos artigos utilizou o M37 do CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) como protocolo de referência (n=7), sendo que dois artigos utilizaram metodologia modificada do protocolo M27 (CSLI) e apenas um usou o EUCAST-E. Em relação à concentração final de conídios por poço, dos 7 artigos que utilizam o protocolo M-38, que recomenda $0,4 - 5 \times 10^4$ /mL, dois deles utilizam esse intervalo enquanto que cinco deles utilizam uma faixa mais estreita $1,5 - 4 \times 10^4$ /mL e apenas um cita 5×10^4 /mL. Já o artigo que se refere ao EUCAST-E, a concentração do inóculo $10 \times$ maior ($2 - 5 \times 10^5$ /mL).

Ao comparar os dados obtidos nos artigos observou-se grande variação no tempo de incubação do ensaio, uma vez que os protocolos de referência não citam os tempos ideais para crescimento das espécies causadoras de CBM. Dos artigos que utilizaram metodologia do M-38, cinco artigos reportaram incubação de 5 a 7 dias, dois artigos utilizaram 3 dias de incubação e apenas um 4 a 5 dias. O trabalho de Andrade (2019), único que utiliza o protocolo EUCAST-E, utilizou o tempo de incubação de 4 a 5 dias. Ressalta-se que todos os trabalhos reportaram a incubação à 35° C, como é recomendado pelos dois protocolos de referência (CSLI e EUCAST-E), assim como o meio de cultura RPMI-1640. Apenas um artigo que se baseou no M-38 suplementou o meio com 2% de glicose, embora não seja recomendação do protocolo, diferentemente do EUCAST-E.

Diante do levantamento, pôde-se observar que não há um padrão definido para a avaliação da susceptibilidade dos agentes causadores de CBM a drogas antimicrobianas. Observou-se ainda a ausência de limites de referência para as drogas antifúngicas convencionais. Também não foram identificadas nos protocolos cepas de referência para estes

fungos. Apesar disto, recentemente Hellwig e colaboradores (2018), por meio de revisão de literatura, identificaram o perfil de suscetibilidade comum dos agentes causadores de CBM a drogas antifúngicas.

Após a análise, a escolha pelo protocolo EUCAST- E.DEF 9.3 foi feita baseada nos critérios: o protocolo EUCAST-E é de fácil e gratuito acesso, a concentração final do inóculo é maior, e o meio é suplementado com glicose 2%, o que facilita o crescimento dos fungos do gênero *Fonseaea* sp, uma vez que são fungos de crescimento lento.

Os parâmetros adotados para os testes foram: incubação a 35°C durante cinco dias, densidade final de 5×10^5 conídios/mL e utilização de meio RPMI 1640 com suplementação de glicose 2%. A temperatura escolhida foi de 35°C pois de acordo com Odom e colaboradores (1997), as drogas inibidoras da via da cna não são tóxicas a 24°C para *C. neoformans in vitro* mas sim em temperaturas mais elevadas. Os ensaios foram realizados em triplicatas independentes em dias diferentes. As drogas que tiveram sua concentração mínima inibitória determinadas foram: anfotericina B, itraconazol e fluconazol.

As concentrações mínimas inibitórias encontradas de anfotericina B para os isolados clínicos de *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica* no presente trabalho foram de 0,25-0,5 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,125-0,5 µg/mL, respectivamente. De acordo com Hellwig e colaboradores (2018) que avaliaram diferentes estudos de CIM para agentes patogênicos de cromoblastomicose, a CIM para os isolados de *Fonsecaea* sp. variou de 0,5-16 µg/mL, para *F. pedrosoi* foi de 0,75 a 32 µg/mL, para *F. monophora* foi 2 µg/mL, esses estudos utilizaram o protocolo de CLSI M38-A, para fungos filamentosos.

Andrade e colaboradores (2019) determinaram a CIM de anfotericina B, utilizando o protocolo EUCAST para *F. pedrosoi* e para *F. nubica* de 0,25 a 1 µg/mL, curiosamente este grupo não analisou a espécie *F. monophora*. Para *F. nubica* de acordo com Zhang e colaboradores (2019) a CIM de anfotericina B foi de 4 µg/mL e para a mesma espécie segundo Coelho e colaboradores (2018) variou de 4 a 16 µg/mL, esses foram os resultados com valores mais elevados para *F. nubica* encontrados nos artigos analisados e ambos os estudos utilizaram o protocolo de CLSI M38-A. A CIM de anfotericina B para *F. monophora* reportada foi de 4-16 µg/mL e para *F. pedrosoi* foi de 4 a 8 µg/mL (Coelho et al, 2018).

De acordo com Rojas (2015) a concentração mínima inibitória de anfotericina B para *F. pedrosoi* foi de 1-4 µg/mL. Para *F. pedrosoi* e *F. monophora* a CIM encontrada foi de 2 µg/mL (Badali et al, 2013). Najafzadeh e colaboradores (2009) encontraram 0,5-2 µg/mL para as três espécies analisadas. Yu e seu grupo (2008) encontraram para *F. pedrosoi* a CIM de 0,75-

4 µg/mL. Para *F. pedrosoi* foi de 1-2 µg/mL segundo Caligiorme e colaboradores (1999), de acordo com os experimentos de Bedout e seu grupo (1997) a concentração mínima inibitória para *F. pedrosoi* foi de 0,5 a >16 µg/mL (**tabela 3**).

Tabela 3. Valores de CIM para anfotericina B, Itraconazol e fluconazol dos artigos levantados para o presente trabalho.

	Anfotericina B		
	<i>F. pedrosoi</i>	<i>F. monophora</i>	<i>F. nubica</i>
Presente trabalho	0,25 – 0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	0,125 – 0,5 µg/mL
Hellwig et al (2018)	0,75-32 µg/mL	2µg/mL	
Andrade et al (2019)	0,25 - 1µg/mL		0,25 - 1µg/mL
Zhang et al (2019)			4µg/mL
Coelho et al (2018)	4-8 µg/mL	4-16 µg/mL	4-16 µg/mL
Rojas et al (2015)	1-4µg/mL		
Badali et al (2013)	2µg/mL	2µg/mL	
Najafzadeh et al (2009)	0,5-2 µg/mL	0,5-2µg/mL	0,5-2µg/mL
Caligiorme (1999)	1-2 µg/mL		
Bedout et al (1997)	0,5 a > 16µg/mL		

	Fluconazol		
	<i>F. pedrosoi</i>	<i>F. monophora</i>	<i>F. nubica</i>
Presente trabalho	16 µg/mL	16 µg/mL	16 µg/mL
Coelho et al (2018)	8-16 µg/mL	8-16 µg/mL	
Badali et al (2013)	2µg/mL	2µg/mL	
Najafzadeh et al (2009)	8-32 µg/mL	8-64µg/mL	16-32µg/mL
Caligiorme (1999)	4-64 µg/mL		
Bedout et al (1997)	8-64 µg/mL		

	Itraconazol		
	<i>F. pedrosoi</i>	<i>F. monophora</i>	<i>F. nubica</i>
Presente trabalho	0,06-0,25µg/mL	0,12- 0,5 µg/mL	0,12 – 0,5 µg/mL
Coelho et al (2018)	0,25-1 µg/mL	0,25-1 µg/mL	0,25-1 µg/mL
Badali et al (2013)	0,5µg/mL	0,125µg/mL	
Najafzadeh et al (2009)	0,031-0,25 µg/mL	0,031- 0,25µg/mL	0,031-0,25µg/mL

Para fluconazol a concentração mínima inibitória determinada no presente estudo foi de 16 µg/mL para os três isolados clínicos relativos às três espécies analisadas. A concentração de fluconazol foi a mais elevada dos antifúngicos verificados nesse trabalho, porém, está de acordo

com os achados na literatura. Para *F. pedrosoi* foram encontradas as seguintes concentrações: 8 a 64 µg/mL (Bedout *et al*, 1997) e 4 a 64 µg/mL (Caligiorne *et al*, 1999). Coelho e colaboradores (2018) encontraram a faixa mais baixa de fluconazol para *F. pedrosoi* e *F. monophora*: 8 a 16 µg/mL e para *F. nubica*: 8-32 µg/mL. Badali e colaboradores (2013) determinaram as CIMs para *F. pedrosoi* (>64 µg/mL) e para *F. monophora*, 64 µg/mL. Najafzadeh e colaboradores (2009) encontraram a faixa de 8-32 µg/mL para *F. pedrosoi*, 8-64 µg/mL para *F. monophora* e 16-32 µg/mL para *F. nubica*. Todos os achados indicam que as espécies do gênero *Fonsecaea sp* são consideradas resistentes a este antifúngico.

Para itraconazol as CIMs determinadas neste trabalho foram 0,06-0,25µg/mL para o isolado de *F. pedrosoi* e 0,12-0,5 µg/mL para *F. monophora* e *F. nubica*. Os valores determinados por Badali e seu grupo (2013) foram de 0,5 µg/mL para *F. pedrosoi* e 0,125 µg/mL para *F. monophora*. Segundo Coelho e colaboradores (2018) a faixa encontrada para as três espécies foi de 0,25 a 1 µg/mL e de 0,031 a 0,25 µg/mL determinada por Najafzadeh e seu grupo (2009). O valor mais elevado de CIM relatado nos artigos foi de 2 µg/mL para *F. nubica*.

De acordo com os dados analisados nos estudos aqui verificados os valores de CIM determinados no presente trabalho estão consonância com o esperado, todos os grupos utilizaram o protocolo de CLSI M38-A com exceção de Andrade e colaboradores (2019) que utilizaram o EUCAST-E.

Tabela 4 Resumo das condições para análise de susceptibilidade antifúngica contra agentes causadores da Cromoblastomicose de 1997 a 2019.

Ano	Publicação	Origem dos isolados	Espécies analisadas	Número e fonte dos isolados	Drogas testadas	Meio de cultura	Densidade final (conídios/mL)	Temperatura e tempo de incubação	Protocolo
1997	Bedout C. et al. <i>In vitro</i> susceptibility testing of <i>Fonsecaea pedrosoi</i> to antifungals.	Colômbia	<i>Fp</i>	12 de pacientes	5FC, AMB, FLC, ITC	RPMI 1640	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$	22-24°C/4-5 dias	M-27T
1999	Caligiorme R. et al. <i>In vitro</i> susceptibility of chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis agents to antifungal drugs.	Brasil Holanda, Uruguai Colômbia, Venezuela USA	<i>Cb, Cc, Ed, Ej, Fc, Fp, Pe, Pv, Ra.</i>	18 de pacientes 1 de fontes ambientais	5FC, AMB, FLC, ITC	RPMI 1640	5×10^4	28°C / 5 dias	M-27P
2008	Yu J. et al. <i>In vitro</i> interaction of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblastomycosis in China.	China	<i>Cc, Fp, Pv.</i>	34 de pacientes 19 de fontes ambientais	AMB, ITC, TRB.	RPMI 1640 + 2% glucose	$2,5 \times 10^4$	35°C/ 5-7 dias	M-38A
2010	Najafzadeh M. et al. <i>In Vitro</i> activities of eight antifungal drugs against 55 clinical isolates of <i>Fonsecaea</i> spp.	Vários países	<i>Fm, Fn, Fp.</i>	51 de pacientes 2 de animais 2 de fontes desconhecidas	AMB, ANI, CAS, FLC, ISA, ITC, POS, VRC.	RPMI 1640	$1,5 - 4 \times 10^4$	35°C/ 3 dias	M-38-A2.
2013	Badali H. et al. Chromoblastomycosis due to <i>Fonsecaea pedrosoi</i> and <i>F. monophora</i> in Cuba.	Cuba	<i>Fm, Fp.</i>	2 de pacientes	AMB, ANI, CAS, FLC, ITC, POS.	RPMI 1640	$1,5 - 4 \times 10^4$	35°C/ 3 dias	M-38-A2
2014	Daboit TC. et al. <i>In vitro</i> susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and to the combination of terbinafine and amphotericin B.	Brasil	<i>Cc, Fsp, Pv, Ra, Es.</i>	58 de pacientes 2 da ATCC	AMB, ITC, KTC, TRB, VRC.	RPMI 1640	$1,5-4 \times 10^4$	35°C / 5 dias	M-38-A2

2015	Rojas O. et al. Phenotypic and molecular identification of <i>Fonsecaea pedrosoi</i> strains isolated from chromoblastomycosis patients in Mexico and Venezuela.	México Venezuela	<i>Fp</i>	10 de pacientes	AMB, ITC, POS, TRB, VRC.	RPMI 1640	0,4 - 5 × 10 ⁴	35°C / 5 días	M-38-A2
2018	Coelho R. et al. Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of clinical strains of <i>Fonsecaea</i> spp. isolated de pacientes with chromoblastomycosis in Rio de Janeiro, Brazil.	Brazil	<i>Fm, Fn, Fp.</i>	20 de pacientes	5FC, AMB, CAS, FLC, ITC, KTC, MFG, POS, RVC, TRB, VRC.	RPMI 1640	0.4 - 5 × 10 ⁴	35°C / 5 días	M-38-A2
2019	Zhang J. et al. Synergistic effect of terbinafine and amphotericin B in killing <i>Fonsecaea nubica</i> <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .	China	<i>Fn</i>	21	AMB, CAS, ITC, TRB, VRC.	RPMI 1640	2 × 10 ⁴	35°C / 5 días	M-38-A2
2019	De Andrade T. et al. Chromoblastomycosis in the Amazon region, Brazil, caused by <i>Fonsecaea pedrosoi</i> , <i>Fonsecaea nubica</i> , and <i>Rhinocladiella similis</i> : Clinicopathology, susceptibility, and molecular identification.	Brazil	<i>Fn, Fp, Rs.</i>	12 de pacientes	AMB, 5FC, TRB, ITC, VRC.	RPMI 1640 + 2% glucose	2 - 5 × 10 ⁵	35°C / 4- 5 días	EUCAST- E.DEF 9.3

¹Cb (*Cladophialophora bantiana*), Cc (*Cladophialophora carrionii*), Ed (*Exophiala jeanselmei*), Ej (*Exophiala dermatitidis*), Ek (*Exophiala spinifera*), Fc (*Fonsecaea compacta*), Fm (*Fonsecaea monophora*), Fn (*Fonsecaea nubica*), Fp (*Fonsecaea pedrosoi*), Fsp (*Fonsecaea spp.*), Fe (*Phaeoannellomyces elegans*), Pv (*Phialophora verrucosa*), Ra (*Rhinocladiella aquaspersa*), Rs (*Rhinocladiella similis*).

²5FC (5-Fluorotocine), AMB (Amphotericin B), AFG (Amidulfungin), CAS (Caspofungin), FLC (Fluconazole), ITC (Itraconazole), KTC (Ketoconazole), MFG (Micafungin), POS (Posaconazole), RVC (ravuconazole), VRC (Voriconazole), TRB (Terbinafine). ATCC: American Type Culture Collection

Avaliação da viabilidade celular por meio do indicador de oxido-redução, Resazurina em ensaio para determinação CIM de *Fonsecaea* sp

Fungos filamentosos formam hifas e micélio a partir da extensão das suas pontas, e o micélio geralmente é disperso no meio líquido o que torna difícil medir a turbidez em comparação com as leveduras (Monteiro *et al*, 2012).

Existem diferentes formas de mensurar a viabilidade da amostra analisada, alguns desses métodos utilizam a medida de compostos intermediários da atividade mitocondrial. São os conhecidos sais de tetrazólio: MTT, XTT, INT, WST para citar alguns exemplos. Esses são reduzidos em formazan e a sua quantidade produzida é medida através da leitura de absorbância.

Foi descrito que alguns desses sais são tóxicos para bactérias o que podem gerar um resultado equivocado na verificação da viabilidade celular (Braissant *et al*, 2020). Tsukatani e seu grupo (2009) descreveram a redução do composto XTT pelos componentes dos meios de cultura utilizados, peptona, proteínas glicadas e agentes antimicrobianos. A redução não celular de sais de tetrazólio gera uma análise equivocada acerca das atividades dos agentes antimicrobianos (Tsutakani *et al*, 2013). Esse método já foi utilizado por Deng e colaboradores (2018) para analisar a atividade antimicrobiana de anfotericina B com terbinafina para isolados de fungos causadores de CBM, dentre eles, *Fonsecaea* sp.

Outro método utilizado para verificar a viabilidade celular é através do sal de sódio de Resazurina, um composto de cor roxa-azulada que é oxidado a um produto de coloração rosa, a resorufina. Primeiramente a Resazurina foi comercializada com o nome de Alamar Blue, porém, atualmente está disponível com outras denominações. Levando este fato em consideração o composto de sal de Resazurina é mais economicamente viável que a sua versão comercial (Monteiro *et al*, 2013).

Foi descrito o uso da Resazurina em testes de drogas para *Aspergillus fumigatus*, e os autores afirmam que a utilização desse método é fácil de implementar e de interpretar, possui baixo custo, 1g de Resazurina custa 236 reais enquanto 100mg de XTT custa 1120 reais, e fornece resultados rápidos (Monteiro *et al*, 2013). Segundo Repp e colaboradores (2007) que verificou a utilização do Alamar Blue para *Candida albicans*, o uso desse composto, depende da viabilidade celular do fungo, logicamente, e, não possui problemas relacionados à toxicidade. É um método mais fácil e suas desvantagens são a sensibilidade ao calor e a luz.

A fim de melhorar a identificação da CIM e quantificar o crescimento fúngico como é requerido para utilização de programas que analisam a interação entre drogas por meio de

algoritmos decidiu-se no presente trabalho utilizar o indicador de oxido-redução, resazurina para avaliação do crescimento dos isolados de *Fonsecaea sp.* Ressalta-se que apesar do método de XTT ter sido utilizado previamente para este fim em isolados de *Fonsecaea sp.*, a resazurina é economicamente mais viável. Ao ser reduzida, a coloração roxa torna-se rosa, indicando a viabilidade celular.

Foi feita a comparação entre as diferentes tonalidades de coloração entre roxa e rosa com o crescimento dos fungos através da inspeção microscópica. Nem sempre a cor roxa era indicativa de inibição do crescimento fúngico, porém, sempre que se observou as diferentes tonalidades para a rosa observou-se o crescimento do fungo, microscopicamente. Foi possível relacionar as diferentes colorações com o desenvolvimento fúngico. Por exemplo, a coloração de roxo claro é indicativa de menor crescimento em comparação às tonalidades de rosa, sendo que rosa mais claro significa maior crescimento.

Evidentemente, a inspeção feita de maneira macroscópica possui o viés da subjetividade, além de não ser viável a inspeção microscópica para a rotina laboratorial sem fins científicos, dessa forma, a leitura das densidades ópticas para a redução e oxidação do composto deve ser realizada. São utilizados dois comprimentos de onda para as leituras, o de 570nm para a excitação e o de 600nm para a emissão. Os valores dessas leituras são utilizados para a geração de gráficos que identificam a porcentagem de redução da resazurina e assim correlacionar com a porcentagem de crescimento em relação ao controle positivo. Esses gráficos serão apresentados e melhor discutidos nos próximos resultados.

Devido aos fungos do gênero *Fonsecaea sp.* serem filamentosos também não é indicada a avaliação da viabilidade celular através da contagem de unidades formadoras de colônia (CFU), pois, diferentemente das leveduras, uma hifa não dá origem a uma colônia, tornando esse teste inviável para tal finalidade.

Determinação da CIM de *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica* para as drogas inibidoras da via da calcineurina

Desde a sua descoberta a cromoblastomicose é tratada de diversas maneiras, desde métodos físicos até terapia sistêmica e tópica com agentes antifúngicos (Queiroz-Telles *et al*, 2017). A terapia em casos mais severos pode ser combinada entre procedimentos físicos com antifúngicos, bem como pela combinação de medicamentos com diferentes alvos terapêuticos. Apesar dessas possibilidades, não existe um consenso da melhor droga a ser utilizada. Terbinafina e Itraconazol são as escolhas de primeira linha para a terapêutica (Hellwig *et al*,

2018). Além disso, é primordial ressaltar a inexistência de ensaios clínicos randomizados para a escolha da terapia, reforçando a relevância dos ensaios *in vitro* de suscetibilidade a antifúngicos como alternativa para ajudar na escolha da melhor estratégia a ser seguida (Heidrich *et al*, 2021).

Com o intuito de verificar novas possibilidades terapêuticas, vários trabalhos avaliaram o bloqueio da via calcineurina em diferentes fungos, dada a importância desta via na biologia e virulência dos fungos patogênicos (Juvvadi *et al*, 2015; Lamothe *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2012; Gao *et al*, 2017; Kotoyannis *et al*, 2007). Além disto, também foram analisadas combinações de inibidores da via de Cna com outras drogas antifúngicas em testes *in vitro* de suscetibilidade a drogas. Neste trabalho realizou-se testes em triplicatas de CIM para as três linhagens com o intuito de determinar a concentração das drogas, FK506, ciclosporina A. Os resultados das CIMs para os três isolados analisados estão compilados na **Tabela 5** a seguir.

Tabela 5. Valores de CIM em $\mu\text{g/mL}$ das drogas inibitórias da via da Cna e antifúngicos para as três espécies estudadas.

	<i>F. pedrosoi</i>	<i>F. monophora</i>	<i>F. nubica</i>
FK506	>64	>64	32
Ciclosporina A	>64	>64	>64
Anfotericina B	0,25-0,5	0,5	0,125-0,5
Itraconazol	0,06-0,25	0,125-0,5	0,125-0,5
Fluconazol	16	16	16

Em relação aos inibidores da via da Cna, *F. nubica* foi a única espécie das três estudadas nesse trabalho que apresentou susceptibilidade para uma das duas drogas analisadas, FK506, e ainda assim a sua CIM foi relativamente alta (32 $\mu\text{g/mL}$), enquanto as outras espécies não apresentaram alteração do crescimento em nenhuma das concentrações estudadas. A CIM determinada de Ciclosporina A para as três espécies foi ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ e de FK506 para *F. monophora* e *F. pedrosoi* também foi ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$.

Ao avaliarem a susceptibilidade de 30 isolados de *Aspergillus*, Schwarz e Dannaoui (2020) verificaram que as drogas imunossupressoras Ciclosporina A e FK506 sozinhas não exibiram atividade *in vitro*, exceto para quatro isolados. Gao e Sun (2015) verificaram que a mínima concentração inibitória para biofilme de *Aspergillus sp.* foi ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ para FK506. Contrariamente, trabalho anterior relatou média geométrica da CIM para oito isolados de *A.*

fumigatus de 6,25 µg/mL e 1,56 µg/mL, para Ciclosporina A e FK506, respectivamente (Steinbach *et al*, 2004).

A alta CIM também foi relatado por Li e colaboradores (2008) ao determinarem o valor de 512 µg/mL para ciclosporina A para isolados de *Candida albicans*. Já para os dermatófitos (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*) analisados por Zhang e seu grupo (2018) valores de CIMs verificados para FK506 foram de ≥ 8 µg/mL. O fungo dimórfico *Talaromyces marneffeii* teve sua CIM determinada como 100 µg/mL e 20 µg/mL para ciclosporina A e FK506, respectivamente (Mo *et al*, 2014).

Os resultados apresentados no presente trabalho indicam que *F. monophora*, *F. pedrosoi* e *F. nubica* são resistentes para Ciclosporina A, assim como, descrito para outros fungos patogênicos. *F. monophora* e *F. pedrosoi* apresentam maior resistência ao FK506, quando comparado à *F. nubica*. Foi observado após inspeção microscópica dos poços, nas maiores concentrações testadas das drogas inibidoras da via Cna, uma discreta diminuição de hifas, sugerindo um possível efeito dose-dependente.

As hifas que cresceram eram mais sinuosas, menores e mais ramificadas nos poços em que o fungo estava com Ciclosporina A ou FK506 em comparação com o controle positivo de crescimento, no qual observa-se o desenvolvimento de hifas menos ramificadas, são mais retas e mais alongadas (**Figura 9**). Steinbach e seu grupo (2007) verificaram o efeito de FK506 em *A. fumigatus* e observaram que o crescimento desse fungo foi retardado e a extensão do seu tubo germinativo foi mais demorada em concentrações de apenas 20 ng/mL de FK506.

Para confirmar que de fato as drogas FK506 e ciclosporina estavam funcionando adequadamente foi realizado o ensaio para checar a CIM para linhagem de referência H99 de *Cryptococcus neoformans*. Utilizou-se como controle a Anfotericina B (**Figura 10**). *C. neoformans* se mostrou susceptível às drogas testadas, com CIM de 31,25-62,5 ng/mL, 0,62 µg/mL e 0,05 µg/mL para FK506, ciclosporina A e anfotericina B, respectivamente. A relação entre esse fungo e as drogas utilizadas foi estudada por Kontoyiannis e seu grupo (2008) que documentaram baixas CIMs para esses compostos reiterando que a espécie *C. neoformans* é sensível para tais drogas. Estes resultados demonstraram que de fato os inibidores de calcineurina estavam com a atividade preservada e os isolados de *Fonsecaea* sp analisados neste trabalho apresentam menor susceptibilidade a estas drogas.

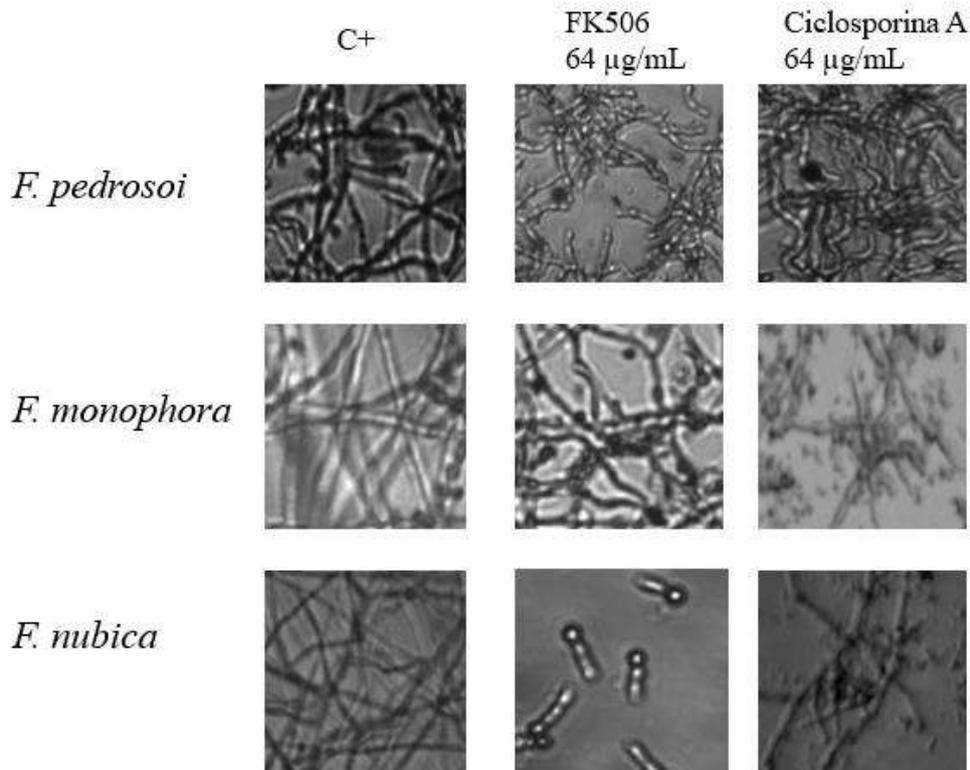


Figura 9. Microscopia óptica em aumento de 20× de *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica* em meio RPMI 1640, com suplementação de FK506 ou ciclosporina A ambos em concentração de 64 µg/mL.

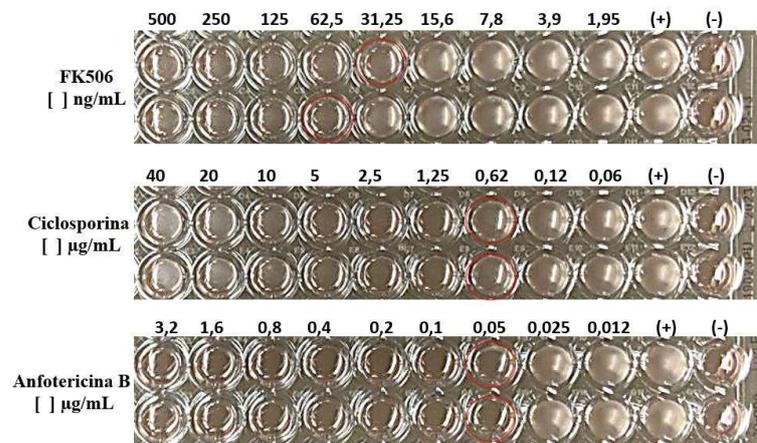


Figura 10. Ensaio para avaliação da mínima concentração inibitória das drogas FK506, Ciclosporina A e Anfotericina B para a espécie fúngica *C. neoformans*, H99.

Algumas hipóteses foram levantadas para responder o porquê dos fungos *Fonsecaea* sp não serem suscetíveis aos inibidores da via da calcineurina. As espécies aqui estudadas possuem como componente importante presente na parede celular a melanina, descrito como fator de virulência que ajuda na sobrevivência do fungo frente a agentes estressores. Uma vez que as drogas utilizadas modificam o ambiente em que o fungo se encontra, é possível que a melanina interfira na ação das drogas, afetando assim susceptibilidade dos patógenos. Também pode-se sugerir que os inibidores de calcineurina não consigam adentrar ao fungo. Sabe-se que os

fungos causadores de CBM possuem parede celular espessa e que a natureza da molécula (carga, polaridade, tamanho) pode afetar a entrada na célula. Além disto, pode estar ocorrendo a ação de bombas de efluxo, que devolvem esse composto para o meio extracelular, limitando a sua concentração intracelular.

Além das hipóteses levantadas, deve-se também avaliar a interação das drogas com seus ligantes (Fkbp12 e ciclofilina A). Como as drogas são utilizadas como imunossuppressores em humanos, pode-se especular que as mesmas apresentam baixa afinidade aos ligantes fúngicos, ou que a mudança conformacional no complexo inibidor da via da calcineurina pode não ocorrer de maneira exata para que essa via seja, de fato, inibida. Na sessão a seguir, este trabalho se propôs avaliar se a melanina produzida de forma constitutiva interfere de alguma forma na susceptibilidade de *Fonsecaea* aos inibidores de Cna. Todas as outras hipóteses devem ser investigadas no futuro e os resultados podem colaborar para o entendimento da resistência de *Fonsecaea* frente às drogas FK506 e ciclosporina A.

Avaliação da interferência da melanina na resistência de *Fonsecaea* sp. a FK506 e Ciclosporina A

A melanina foi descrita como fator de virulência para os fungos e sua atividade está relacionada com a termoestabilidade fúngica, ação anti-oxidante e antirradioativa, auxiliando na sobrevivência do patógeno dentro do hospedeiro (Cunha *et al*, 2005). Para verificar se a melanina influencia susceptibilidade de *Fonsecaea* aos inibidores da via Cna foi utilizado o composto triciclazol, um conhecido inibidor da síntese de DHN-melanina.

Primeiramente foi determinada a CIM de triciclazol frente ao isolado de *F. pedrosoi* para identificação da concentração ideal para o uso nos experimentos posteriores (**Figura 11A**). A CIM determinada visualmente foi de 62,5 µg/mL. Para certificar-se da existência de crescimento fúngico em concentrações menores foi verificado cada poço através da microscopia óptica (**Figura 11B**), dessa forma, concluiu-se que em 62,5 µg/mL de triciclazol o crescimento do fungo foi totalmente inibido. Em todas as concentrações testadas observou-se alteração da coloração do meio de cultura para marrom caramelo indicativo do bloqueio da síntese de DHN- melanina e acúmulo de precursores intermediários da via. Para os experimentos seguintes foi utilizada a concentração de 4 µg/mL de triciclazol, pois, de acordo com a inspeção microscópica dos poços, o crescimento das hifas nessa concentração estava similar ao controle sem o inibidor.

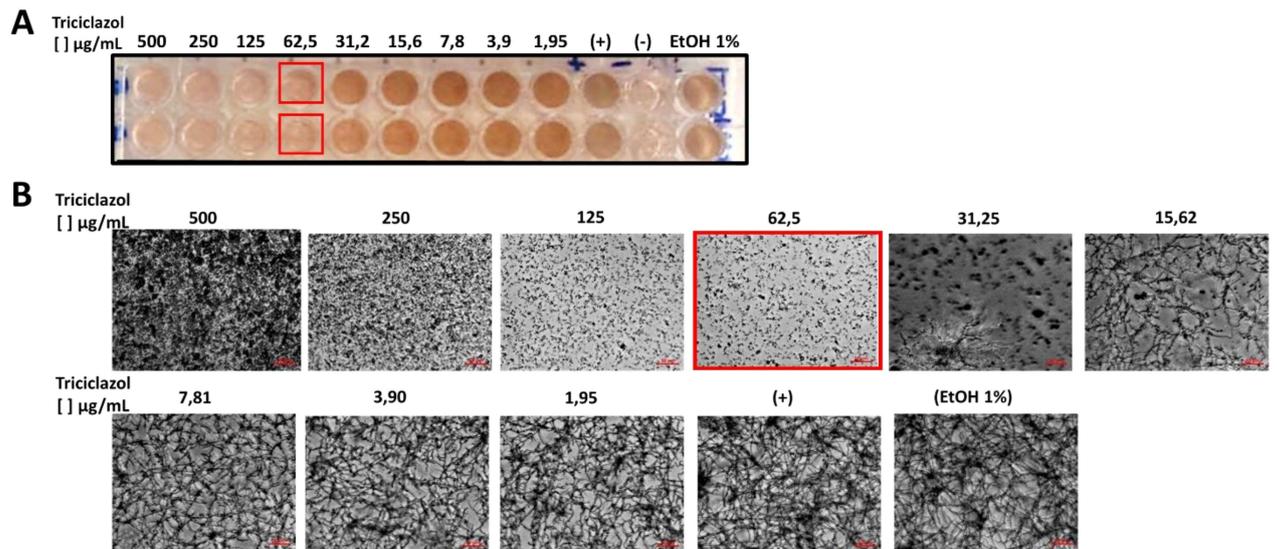


Figura 11. Determinação da concentração mínima inibitória de triclazol para *F. pedrosoi*. Em vermelho está indicado a CIM. A. Foto dos poços para visualização da coloração decorrente da inibição da síntese de melanina B. Visualização microscópica dos poços para verificar o crescimento fúngico. Escala 50 µm.

Para verificar a influência da melanina na susceptibilidade de *Fonsecaea* foram realizados ensaios de determinação das CIMs de FK506, ciclosporina A e itraconazol em quatro diferentes condições para os três isolados analisados no trabalho.

A primeira condição (C1) consistiu no crescimento do fungo previamente ao teste por 10 dias em meio de cultivo batata dextrose suplementado com 4 µg/mL de triclazol e a adição de triclazol também na concentração de 4 µg/mL ao meio de cultura utilizado para realizar o teste, RPMI 1640. Na segunda condição (C2) o fungo foi crescido em meio batata dextrose suplementado com 4 µg/mL de triclazol, no entanto não foi adicionado triclazol ao meio RPMI1640. A terceira condição (C3) foi composta pelo cultivo do fungo em meio batata dextrose sem adição de triclazol, no entanto ao RPMI 1640 foram adicionados 4 µg/mL de triclazol. Por fim, a quarta condição (C4) foi composta pelo fungo sem qualquer tratamento (**Figura 7**).

Para *F. pedrosoi* e *F. monophora* (**Figuras 12 e 13**) foi observada uma diminuição no CIM de uma casa para itraconazol na condição C1, enquanto que em C3 para *F. monophora* houve a diminuição de duas casas para a mesma droga. Para *F. monophora* na presença de ciclosporina A não ocorreu alteração de crescimento na presença do inibidor de melanina, enquanto que para *F. pedrosoi* observou-se uma diminuição de hifas nos poços de concentrações de 64 e 32 µg/mL na condição C1. Para FK506 ocorreu uma diminuição sutil no crescimento fúngico do isolado de *F. pedrosoi*, nas concentrações de 64, 16 e 32 µg/mL na condição C1 e

na concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$ da condição C3. Nenhuma alteração de crescimento na presença de FK506 foi evidenciada para o isolado de *F. monophora*.

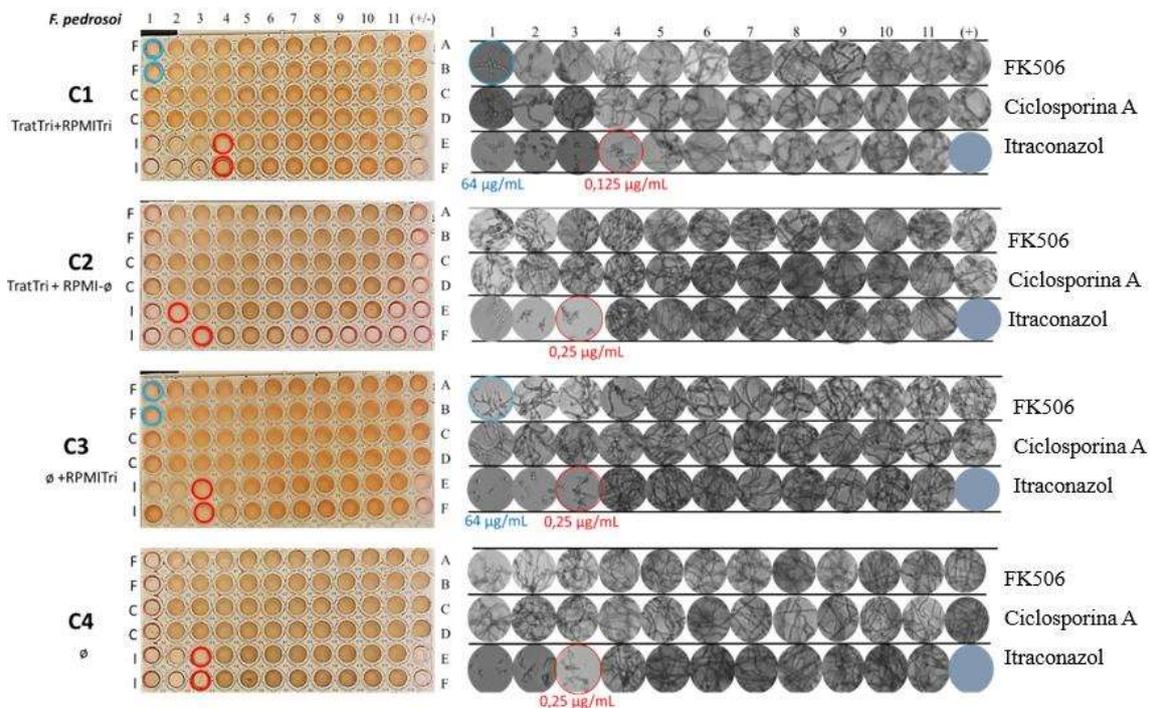


Figura 12. Determinação da CIM na presença de triciclazol para três drogas em quatro condições diferentes para o *F. pedrosoi*. Linhas A e B: FK506 (F), de 64-0,05 $\mu\text{g/mL}$; linhas C e D: ciclosporina A (C) de 64-0,05 $\mu\text{g/mL}$, linhas E e F, itraconazole (I) de 1-0,0005 $\mu\text{g/mL}$. **C1**, inóculo tratado com triciclazol e adição de triciclazol no RPMI1640. **C2**, inóculo tratado com triciclazol, porém sem adição de Triciclazol ao RPMI1640. **C3**, inóculo sem tratamento com triciclazol com com adição de triciclazol no RPMI 1640. **C4**, nenhuma adição de triciclazol. As CIMs das drogas testadas estão indicadas na imagem.

Ao analisar o mesmo experimento para *F. nubica* (**Figura 14**), notou-se que esse isolado apresentou-se mais susceptível às drogas testadas na presença de triciclazol. Ao comparar a condição C1 com C4 observou-se diminuição do CIMs para as três drogas testadas, para FK506 decaiu duas casas, sendo a CIM de 8 $\mu\text{g/mL}$ (C4 foi 32 $\mu\text{g/mL}$), para ciclosporina encontrou-se a CIM de 64 $\mu\text{g/mL}$ (em C4 foi > 64 $\mu\text{g/mL}$) e para Itraconazol a CIM em C4 foi 0,5 $\mu\text{g/mL}$ enquanto em C1 foi de 0,25 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, não foi apenas na condição C1 que ocorreu a diminuição desses valores, em C2 e C3 a CIM de FK506 foi de 8 e 4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, porém não foram identificadas diferenças de crescimento nas condições testadas em relação ao triciclazol e a ciclosporina A.

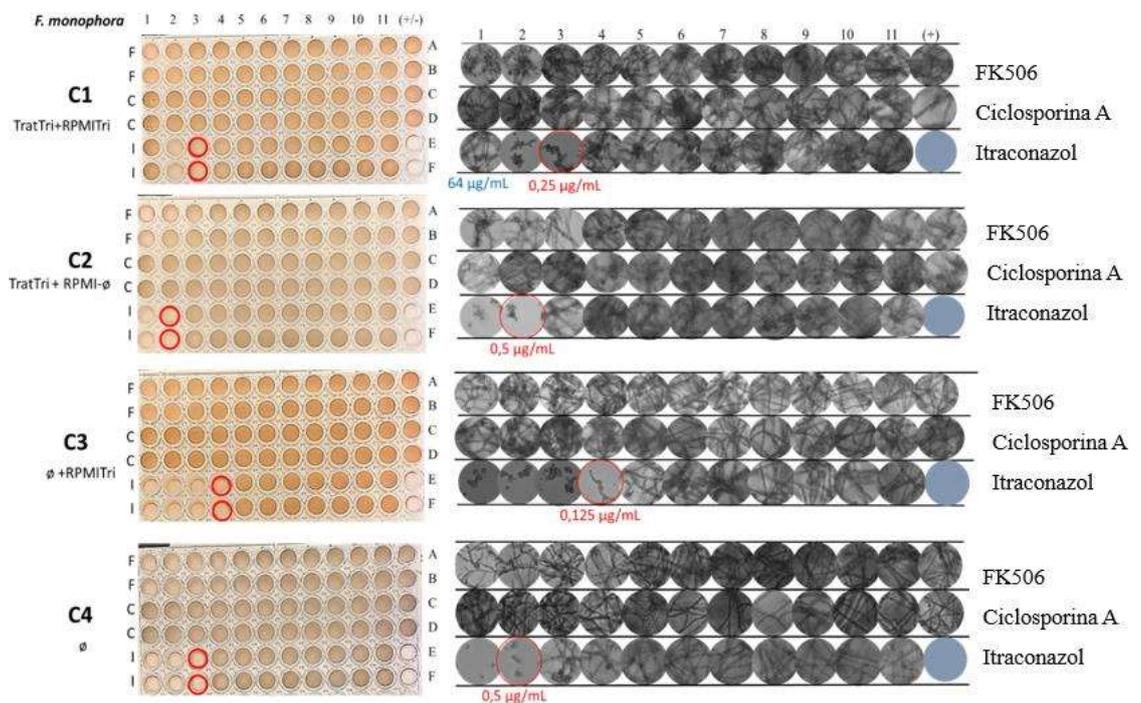


Figura 13. Determinação da CIM na presença de triciclazol para três drogas em quatro condições diferentes para o *F. monophora*. Linhas A e B: FK506 (F), de 64-0,05µg/mL; linhas C e D: ciclosporina A (C) de 64-0,05µg/mL, linhas E e F, itraconazole (I) de 1-0,0005 µg/mL. **C1**, inóculo tratado com triciclazol e adição de triciclazol no RPMI1640. **C2**, inóculo tratado com triciclazol, porém sem adição de Triciclazol ao RPMI1640. **C3**, inóculo sem tratamento com triciclazol com com adição de triciclazol no RPMI 1640. **C4**, nenhuma adição de triciclazol. As CIMs das drogas testadas estão indicadas na imagem.

Heidrich e colaboradores (2021) verificaram a influência da melanina sintetizada por fungos do gênero *Fonsecaea* sp., na susceptibilidade a drogas antifúngicas. Neste trabalho foi utilizada a concentração de 16 µg/mL de triciclazol na preparação do inóculo e no meio RPMI 1640 e foram determinadas as CIMs para diferentes agentes antifúngicos incluindo itraconazol. Os autores observaram uma diminuição de uma casa decimal na média geométrica das CIMs de terbinafina, posaconazol e itraconazol para 57 isolados de *Fonsecaea* spp.

Os nossos resultados apesar de não demonstrarem grande influência da melanina na susceptibilidade dos isolados de *F. pedrosoi* e *F. monophora* aos inibidores da via de calcineurina, mostram um discreto aumento da susceptibilidade para *F. nubica*. Estas diferenças em relação ao trabalho de Heidrich et al., 2021 podem ser atribuídas a concentração mais baixa de triciclazol utilizada no presente estudo, bem como ao número de isolados testados. Um aumento no número de isolados poderia manifestar um efeito mais pronunciado da melanina na resistência aos inibidores avaliados. Ainda assim os achados mostram que a diminuição da CIM

é mais evidente na condição experimental 1, em que o triciclazol está presente em todo o processo, desde o preparo do inóculo até a incubação do fungo com as drogas.

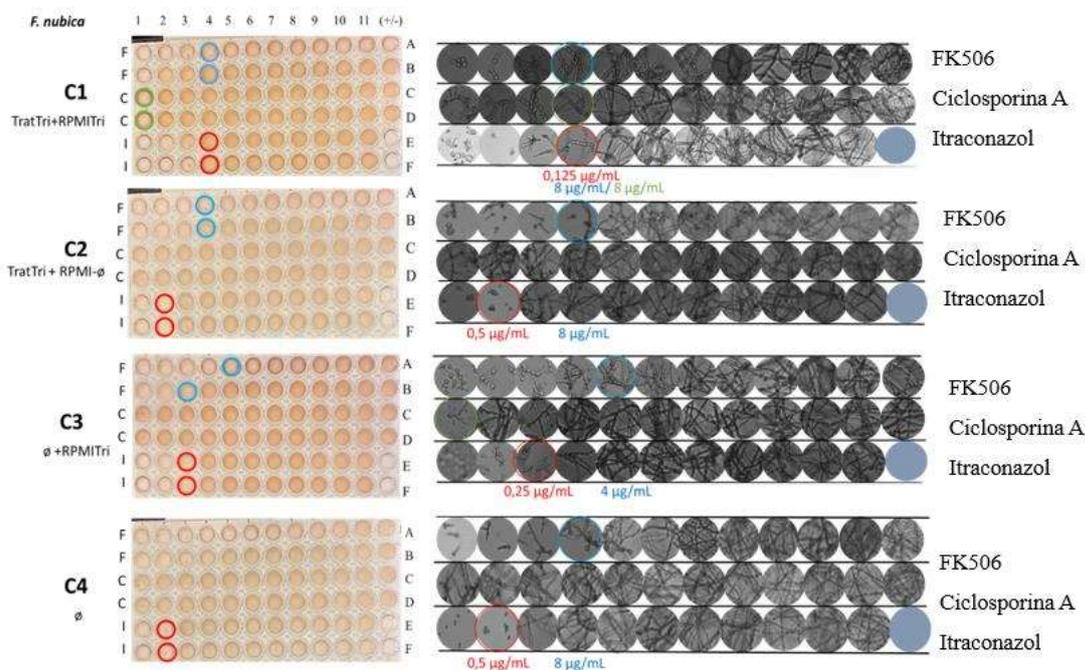


Figura 14. Determinação da CIM na presença de triciclazol para três drogas em quatro condições diferentes para o *F. nubica*. Linhas A e B: FK506 (F), de 64-0,05µg/mL; linhas C e D: ciclosporina A (C) de 64-0,05µg/mL, linhas E e F, itraconazole (I) de 1-0,0005 µg/mL. C1, inóculo tratado com triciclazol e adição de triciclazol no RPMI1640. C2, inóculo tratado com triciclazol, porém sem adição de Triciclazol ao RPMI1640. C3, inóculo sem tratamento com triciclazol com com adição de triciclazol no RPMI 1640. C4, nenhuma adição de triciclazol. As CIMs das drogas testadas estão indicadas na imagem.

Interação entre as drogas FK506 e Itraconazol e Anfotericina B para *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica*

Após a determinação das concentrações mínimas inibitórias foi possível dar prosseguimento aos testes de *checkerboard*, uma vez que estes utilizam como ponto de comparação valores menores que os CIMs em que ocorrem a inibição do crescimento fúngico.

A fim de determinar se existe interação entre os compostos inibidores da via da calcineurina (FK506 e Ciclosporina A) com antifúngicos (Anfotericina B e Itraconazol) foram realizados testes de *checkerboard*. Foram escolhidos esses compostos antifúngicos pois Anfotericina é utilizada em rotina hospitalar como droga de ataque para conter uma infecção fúngica e Itraconazol é uma das drogas de primeira linha para o tratamento de CBM e é usada a longo prazo para manutenção.

As interações entre os inibidores da via da calcineurina com outros compostos antimicrobianos já foram descritos na literatura. A combinação de FK506 com itraconazol foi verificada para fungos do gênero *Sporothrix* sp por Borba-Santos e colaboradores (2017) que

identificaram o sinergismo entre esses compostos. Schwarz e Dannaoui (2020) estudaram o efeito das drogas inibidoras da via da Cna atuando em conjunto com isavocunazol para *Aspergillus* sp. Sinergismo entre FK506 e caspofungina também já foi documentado em sete de oito isolados clínicos de *A. fumigatus* e a combinação de ciclosporina A com caspofungina foi sinérgica em três dos oito isolados clínicos, de acordo com os trabalhos de Steinbach e sua equipe (2004).

Os ensaios de combinação entre as drogas antifúngicas convencionais e inibidores de calcineurina foram realizados pelo menos três vezes, em experimentos independentes para os três isolados clínicos utilizados no trabalho. O crescimento fúngico de cada combinação foi quantificado pela redução de resazurina e documentado por microscopia óptica.

Para investigar as alterações na viabilidade do fungo em diferentes combinações de drogas, as células foram examinadas através de microscopia óptica em aumento de 20×. Ao verificar poço a poço no microscópio foi possível encontrar divergências entre as cores resultantes da redução da resazurina e o crescimento fúngico correspondente, indicando que nem sempre as cores mais escuras correspondem a uma não metabolização da resazurina (**Figura 15B, 16B, 17B**).

Destaca-se, no ensaio para *F. pedrosoi*, no poço em que há a combinação entre 0,03 µg/mL de itraconazol com 64 µg/mL de FK506 (**Figura 15A**), é possível observar que a coloração de resazurina (roxa -rosada) não é indicativa para o crescimento fúngico, no entanto ao verificar pelo microscópio constata-se que houve uma inicialização do desenvolvimento das hifas, e ao observar pela porcentagem de crescimento em relação ao controle ele acusa a existência de fungos viáveis. A diferença sutil de cores entre os poços (cores intermediárias entre o rosa e o roxo) como roxo-azulado e roxo-pink pode representar padrões de crescimento/viabilidade fúngica que só podem ser confirmados pela combinação dos dados referentes aos cálculos de redução de resazurina e microscopia óptica. Logo para certificar de que há ou não o crescimento da espécie analisada sugere-se também a inspeção mais minuciosa mediante ao uso de microscópio.

Ainda através da análise microscópica foi possível identificar que as atividades das drogas são dose-dependentes. Quanto maior a concentração da droga utilizada, maior é a inibição do crescimento do fungo. O crescimento das hifas pode ser retardado ou até inibido, gerando menor metabolização do composto de resazurina, indicando assim menor viabilidade da espécie. Condição que também foi encontrada ao verificar o crescimento em relação aos inibidores da via da calcineurina isolados (encontram-se selecionados em laranja nas fotos das

placas de ensaio de *checkerboard*, enquanto que itraconazol e anfotericina estão representados em verde).

Este fato foi bem evidente ao analisar a atividade de FK506 em relação ao *F. nubica*, pois esse isolado possui maior sensibilidade a essa droga que as outras duas espécies (**Figura 17A**). Um ponto crítico em relação a identificação da inibição do crescimento fúngico pela microscopia é até quando é possível determinar se os baixos crescimentos das hifas estão diretamente relacionados à CIM. Essa situação gera a necessidade de se utilizar a combinação de diferentes métodos a fim de chegar a um melhor consenso para a determinação das CIMs, consequentemente o tipo de interação entre as drogas combinadas.

A interação entre as drogas foi identificada também por meio do programa *Combeneffit*, que gerou a matriz de crescimento fúngico e os gráficos de interação pelo método de Bliss. O programa produz um gráfico de sinergismo e antagonismo (**Figuras 15E, 16E, 17E**) para demonstrar a interação entre as drogas nas diferentes combinações, as distintas tonalidades de azuis indicam sinergismo, as de vermelho antagonismo e aquelas entre verde e amarelo indicam que não há interação. Desse gráfico foi realizado um mapa de superfície independente de *Bliss* das interações entre as drogas (**Figuras 15F, 16F, 17F**). Ele demonstra por intermédio da alteração na deformidade da superfície as interações entre os compostos, as cores correspondem ao mesmo tipo de analogia entre as drogas das **figuras 15D, 16D e 17D**.

Por esses gráficos é possível a análise de todos os poços em que há combinação entre as drogas sendo plausível a observação do tipo de interação prevalente no ensaio, a classificação que eles indicam são de antagonismo, sem interação ou sinergismo. No entanto esta análise mostrou-se viável apenas para a identificação se há sinergismo ou antagonismo, mas não é possível definir se existe efeito aditivo entre as drogas. Por último foi realizado o cálculo manual de FICI segundo Arikian *et al*, 2002 em condições que o programa *Combeneffit* indicou efeito sinérgico acima de 50%. Todos os resultados foram reunidos e serão apresentados e discutidos nas próximas figuras

Ao utilizar o composto FK506 (CIM > 64 µg/mL) com Itraconazol (CIM = 0,25 µg/mL), observou-se que existe inibição do crescimento do fungo *F. pedrosoi* quando as duas drogas estão combinadas (**Figura 15**). Concentrações de 0,03 µg/mL de itraconazol combinadas a 8, 16 ou 32 µg/mL de FK506 apresentaram-se com efeito sinérgico pronunciado, bem como as combinações de 0,06 µg/mL e 0,125 µg/mL de itraconazol com qualquer concentração testada de FK506. Já para *F. monophora* (CIM de FK506 > 64 µg/mL e de Itraconazol = 0,5 µg/mL) os gráficos gerados pelo programa *Combeneffit* indicaram sinergismo entre as drogas nas

seguintes combinações: 0,06 $\mu\text{g/mL}$ de itraconazol com 16 e 32 de $\mu\text{g/mL}$ de FK506; 0,125 $\mu\text{g/mL}$ de itraconazol associado a concentrações acima de 8 $\mu\text{g/mL}$ de FK506 e 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de itraconazol combinado a concentrações superiores a 4 $\mu\text{g/mL}$ de FK506 (**Figura 16E e F**). Diferentemente do observado para os isolados anteriores não foi detectado sinergismo acima de 50% para qualquer combinação de itraconazol e FK506 para o isolado de *F. nubica* (CIM de FK506 = 32 $\mu\text{g/mL}$ e Itraconazol = 0,5 $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 17 E**).

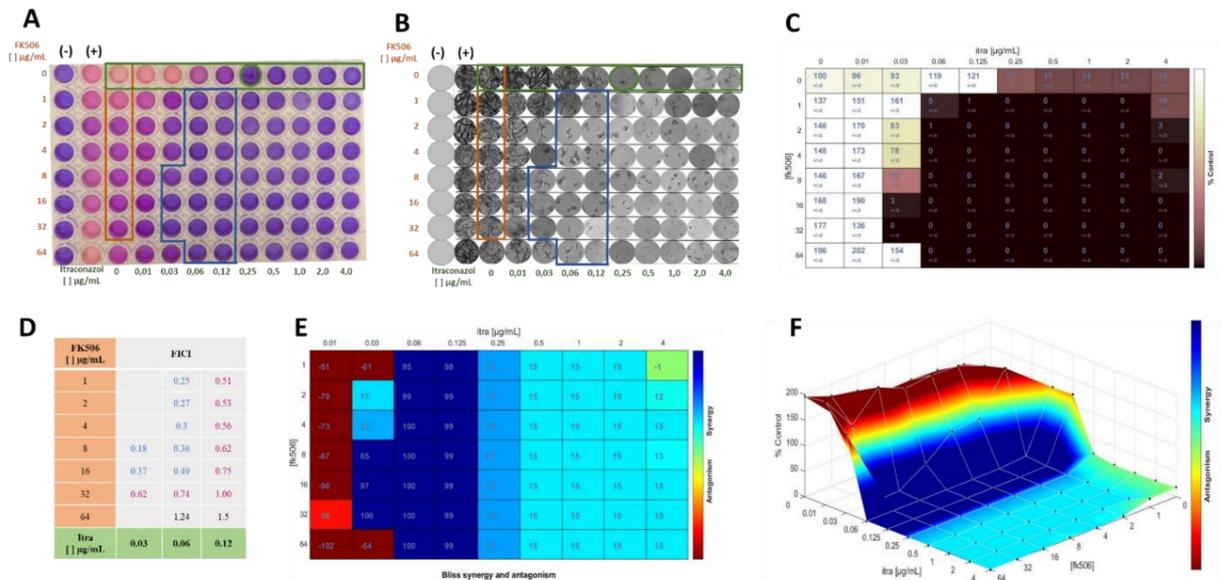


Figura 15. Resultados dos testes de interação entre as drogas FK506 e itraconazol para o fungo *F. pedrosoi*. **A.** Ensaio de *Checkerboard*, na primeira linha selecionada pela cor verde está a CIM de itraconazol, selecionada pela cor vermelha na terceira coluna está a CIM de FK506, as duas primeiras colunas são os controles (positivo de crescimento e negativo de contaminação), enquanto no restante da placa estão as combinações entre as drogas. Selecionados de azul estão as interações que foram indicadas pelo programa com interação sinérgica maior que 50% para o cálculo de FICI. **B.** Visualização do crescimento fúngico através de microscopia óptica (aumento 20 \times). **C.** Matriz de crescimento em relação ao controle positivo (sem nenhuma droga). **D.** Valores do FICI para as combinações selecionadas, sendo azul indicativo de sinergismo, rosa: efeito aditivo, preto: sem interação. **E.** Representação gráfica das interações entre as drogas produzida pelo programa *Combeneft*. **F.** Representação pelo gráfico de superfície independente de *Bliss* das interações entre as drogas.

Após verificar o sinergismo pelo programa *Combeneft* foram selecionados os poços em que foi detectado sinergismo acima de 50% e havia uma relação entre os métodos utilizados para averiguar a ausência de crescimento. Realizou-se o cálculo para determinar o índice de concentração fracionado inibitório (FICI) (**Figura 15D, 16D, 17D**). Os valores em azul indicam sinergismo, em rosa indicam efeito aditivo e em preto sem efeito entre as concentrações das drogas.

Dessa forma, foi possível determinar que há sinergismo entre FK506 e itraconazol nas concentrações de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ de itraconazol com 16 $\mu\text{g/mL}$ e 8 $\mu\text{g/mL}$ de FK506 e 0,06 $\mu\text{g/mL}$ de itraconazol com 16, 8, 4 e 2 $\mu\text{g/mL}$ de FK506 para *F. pedrosoi*, além do efeito aditivo para

outras concentrações. Para *F. monophora* também existe sinergismo entre 0,12 µg/mL de Itraconazol com 8 e 16 µg/mL de FK506 e 0,06 µg/mL de Itraconazol com 16 µg/mL de FK506 e efeito aditivo entre outras combinações das drogas.

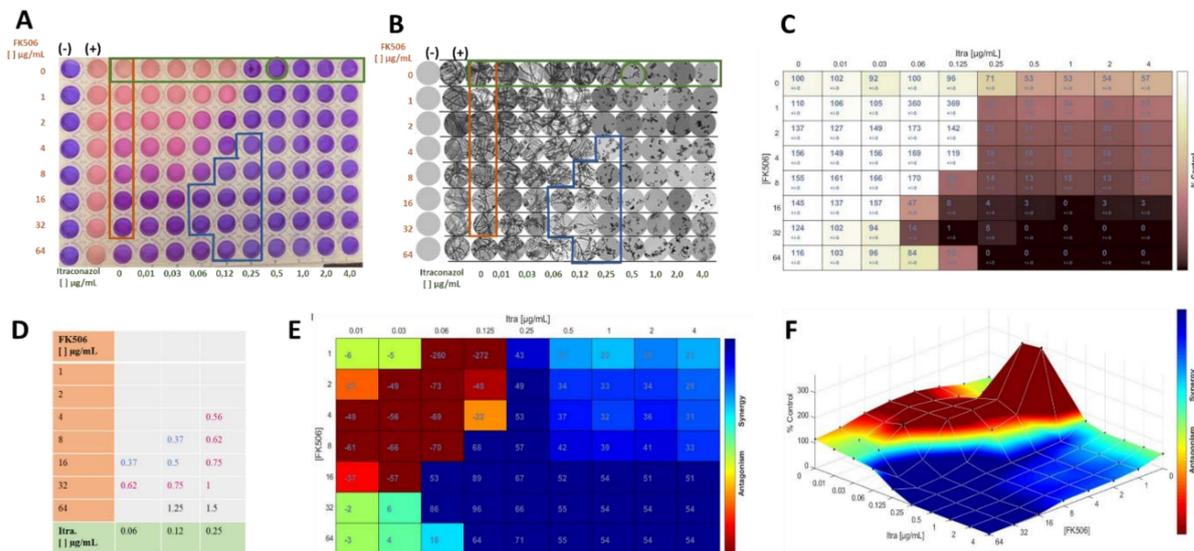


Figura 16. Resultados dos testes de interação entre as drogas FK506 e itraconazol para o fungo *F. monophora*. **A.** Ensaio de *Checkerboard*, na primeira linha selecionada pela cor verde está a CIM de itraconazol, selecionada pela cor vermelha na terceira coluna está a CIM de FK506, as duas primeiras colunas são os controles (positivo de crescimento e negativo de contaminação), enquanto no restante da placa estão as combinações entre as drogas. Selecionados de azul estão as interações que foram indicadas pelo programa com interação sinérgica maior que 50% para o cálculo de FICI. **B.** Visualização do crescimento fúngico através de microscopia óptica (aumento 20×). **C.** Matriz de crescimento em relação ao controle positivo (sem nenhuma droga). **D.** Valores do FICI para as combinações selecionadas, sendo azul indicativo de sinergismo, rosa: efeito aditivo, preto: sem interação. **E.** Representação gráfica das interações entre as drogas produzida pelo programa *CombeneFit*. **F.** Representação pelo gráfico de superfície independente de *Bliss* das interações entre as drogas.

Para *F. nubica* o programa *CombeneFit* não encontrou condições de interações positivas entre as drogas FK506 e itraconazol, no entanto pela microscopia óptica foi possível identificar combinações em que não foi detectado crescimento fúngico. Para estas combinações foi calculado o FICI e constatado que há sinergismo nas combinações de: 0,06 µg/mL de itraconazol e 16 µg/mL de FK506 e 0,12 de itraconazol com 8 µg/mL de FK506, sendo que outras combinações apresentaram efeito aditivo (**Figura 17D**).

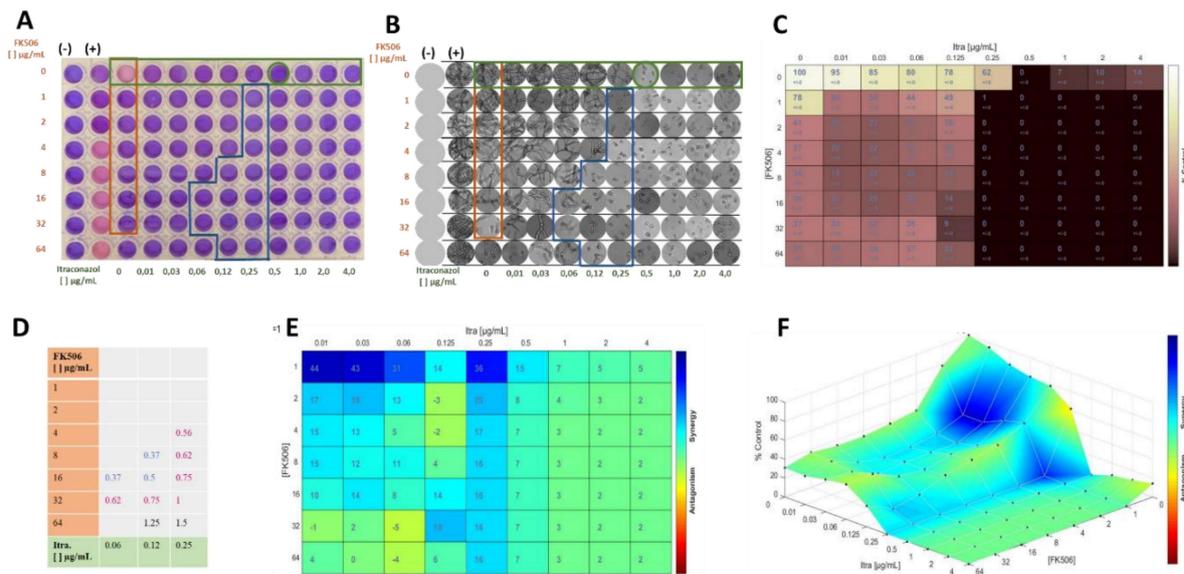


Figura 17. Resultados dos testes de interação (*checkerboard*) entre as drogas FK506 e itraconazol para o fungo *F. nubica*. **A.** Ensaio de *Checkerboard*, na primeira linha selecionada pela cor verde está a CIM de itraconazol, selecionada pela cor vermelha na terceira coluna está a CIM de FK506, as duas primeiras colunas são os controles (positivo de crescimento e negativo de contaminação), enquanto no restante da placa estão as combinações entre as drogas. Selecionados de azul estão as interações em que selecionadas manualmente após a análise microscópica indicando inibição do crescimento para o cálculo de FICI. **B.** Visualização do crescimento fúngico através de microscopia óptica (aumento 20×). **C.** Matriz de crescimento em relação ao controle positivo (sem nenhuma droga). **D.** Valores do FICI para as combinações selecionadas, sendo azul indicativo de sinergismo, rosa: efeito aditivo, preto: sem interação. **E.** Representação gráfica das interações entre as drogas produzida pelo programa Combeneft. **F.** Representação pelo gráfico de superfície independente de Bliss das interações entre as drogas.

Os resultados encontrados para *Fonsecaea* sp são distintos daqueles obtidos por Gao e Sun (2015) que verificaram a atividade de FK506 com Itraconazol para *Aspergillus* sp e dos 20 isolados clínicos nenhum obteve sinergismo e também não ocorreu antagonismo. Não se pode afirmar se houve ação aditiva, pois, os pesquisadores não utilizaram esse parâmetro para a análise. O sinergismo obtido entre FK506 com itraconazol também foi detectado por Shirazi e Kontoyiannis (2013) que estudaram *Rhizopus oryzae*, *Cunninghamella bertholletiae* e *Mucor circinelloides*, fungos causadores da doença mucormicose, e concluíram que há sinergismo entre esses compostos gerando a diminuição da CIM para as duas drogas utilizadas. Segundo esses pesquisadores uma das hipóteses é de que o FK506 aumenta a potência dos inibidores de síntese de ergosterol ao ponto de transformá-los em fungicidas e essa atividade foi mediada por apoptose nos fungos estudados. A morte por apoptose pode ser induzida pelo aumento dos níveis de Ca^{+} intracelular devido à combinação das drogas.

O ensaio de *checkerboard* também foi feito entre FK506 e o antifúngico Anfotericina B para os três isolados clínicos. Notou-se ao comparar as colorações referentes à redução da resazurina com o crescimento fúngico através do microscópio óptico (**Figuras 18B, 19B e 20B**) deparou-se com cores que não correspondiam de maneira exata o que é esperado pela sua

indicação. As cores mais escuras, por vezes, não indicavam a ausência de desenvolvimento do fungo, porém as cores mais claras sempre acusaram crescimento e de acordo com as inspeções via microscópio esta tem correspondência condizente com o esperado.

Foi observado para o fungo *F. pedrosoi* que a coluna referente a concentração de 0,06 µg/mL de Anfotericina B com as diferentes concentrações de FK506, na qual na placa apresenta-se da cor mais escura (idêntica a colunas com maiores concentrações de AnfoB) possui porcentagem de crescimento maior que aquelas, o que é condizente com a inspeção via microscópio óptico mas divergente do indicado pela coloração. O mesmo ocorreu para *F. monophora* porém em concentrações diferentes (0,12 µg/mL de AnfoB com 8, 16, 32 e 64 µg/mL de FK506), enquanto que para *F. nubica*, essa divergência entre cores e crescimento fúngico foi menor que para as outras espécies.

A combinação de FK506 (CIM > 64 µg/mL) com anfotericina B (CIM = 0,5 µg/mL), observou-se que existe inibição do crescimento do fungo *F. pedrosoi* quando as duas drogas estão combinadas (**Figura 18A**). Concentrações de 0,06 µg/mL de anfotericina B combinadas com concentrações de 2 a 16 µg/mL de FK506 apresentaram-se com efeito sinérgico pronunciado tanto pela análise do programa *CombeneFit* quanto pelo cálculo de FICI manual, além destas, outras combinações evidenciaram efeito aditivo pelo cálculo de FICI (**Figura 18 D, E e F**).

Para *F. monophora* (CIM de FK506 > 64 µg/mL e de anfotericina B = 0,5 µg/mL) os gráficos gerados pelo programa *CombeneFit* indicaram sinergismo entre as drogas na combinação de 0,25 µg/mL de anfotericina B com concentrações de 1 a 64 µg/mL de FK506. Os cálculos de FICI manuais indicaram apenas efeito aditivo nestas condições, no entanto ao avaliar a microscopia óptica foram evidenciadas hifas nos poços. Uma possível explicação para estes resultados é que o efeito de morte pode ter sido tardio, permitindo o crescimento inicial das hifas que posteriormente foram mortas e por isso foi detectado ausência de redução de resazurina.

O plaqueamento das hifas coletadas destas combinações responderia à questão se as hifas estão viáveis ou não. Não foi detectado sinergismo ou interação entre as drogas acima de 50% para qualquer combinação de anfotericina B e FK506 para o isolado de *F. nubica* (CIM de FK506 = 32 µg/mL e anfotericina B = 0,5 µg/mL) pelo uso do programa *CombeneFit*, no entanto por inspeção microscópica, coloração obtida da redução de resazurina e cálculo de FICI manual foi possível observar o sinergismo nas condições de 0,12 µg/mL de anfotericina B com 1, 2, 4 e 8 µg/mL de FK506 (**Figura 20D**).

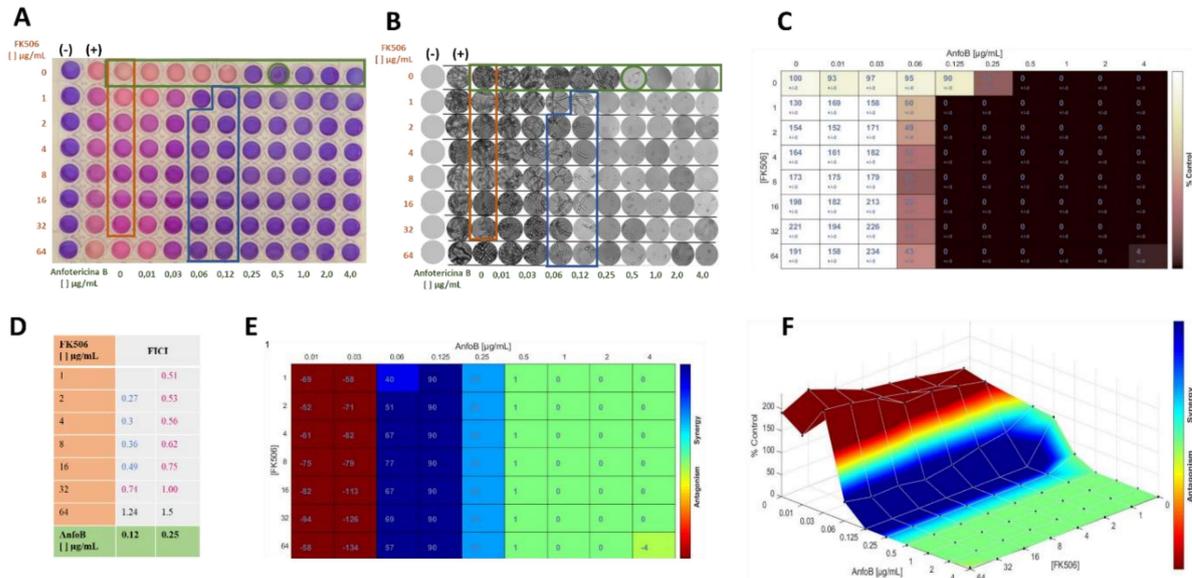


Figura 18. Resultados dos testes de interação entre as drogas FK506 e anfotericina B para o fungo *F. pedrosoi*. **A.** Ensaio de *Checkerboard*, na primeira linha selecionada pela cor verde está a CIM de anfotericina B, selecionada pela cor vermelha na terceira coluna está a CIM de FK506, as duas primeiras colunas são os controles (positivo de crescimento e negativo de contaminação), enquanto no restante da placa estão as combinações entre as drogas. Selecionados de azul estão as interações que foram indicadas pelo programa com interação sinérgica maior que 50% para o cálculo de FICI. **B.** Visualização do crescimento fúngico através de microscopia óptica (aumento 20×). **C.** Matriz de crescimento em relação ao controle positivo (sem nenhuma droga). **D.** Valores do FICI para as combinações selecionadas, sendo azul indicativo de sinergismo, rosa: efeito aditivo, preto: sem interação. **E.** Representação gráfica das interações entre as drogas produzida pelo programa *Combenefit*. **F.** Representação pelo gráfico de superfície independente de *Bliss* das interações entre as drogas.

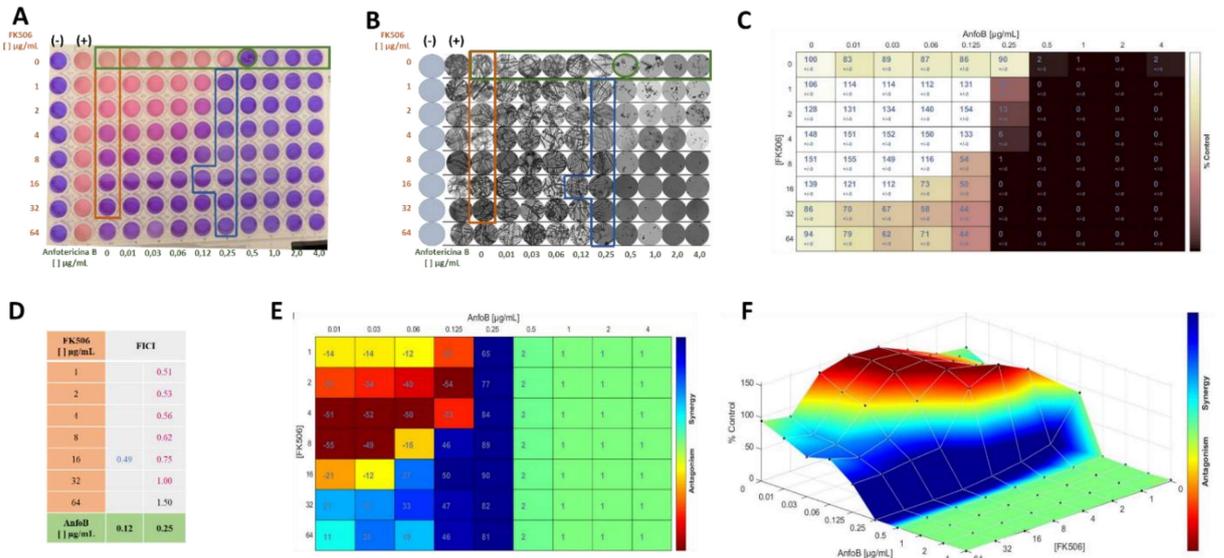


Figura 19. Resultados dos testes de interação entre as drogas FK506 e anfotericina B para o fungo *F. monophora*. **A.** Ensaio de *Checkerboard*, na primeira linha selecionada pela cor verde está a CIM de anfotericina B, selecionada pela cor vermelha na terceira coluna está a CIM de FK506, as duas primeiras colunas são os controles (positivo de crescimento e negativo de contaminação), enquanto no restante da placa estão as combinações entre as drogas. Selecionados de azul estão as interações que foram indicadas pelo programa com interação sinérgica maior que 50% para o cálculo de FICI. **B.** Visualização do crescimento fúngico através de microscopia óptica (aumento 20×). **C.** Matriz de crescimento em relação ao controle positivo (sem nenhuma droga). **D.** Valores do FICI para as combinações selecionadas, sendo azul indicativo de sinergismo, rosa: efeito aditivo, preto: sem interação. **E.**

Representação gráfica das interações entre as drogas produzida pelo programa *Combenefit*. **F.** Representação pelo gráfico de superfície independente de *Bliss* das interações entre as drogas.

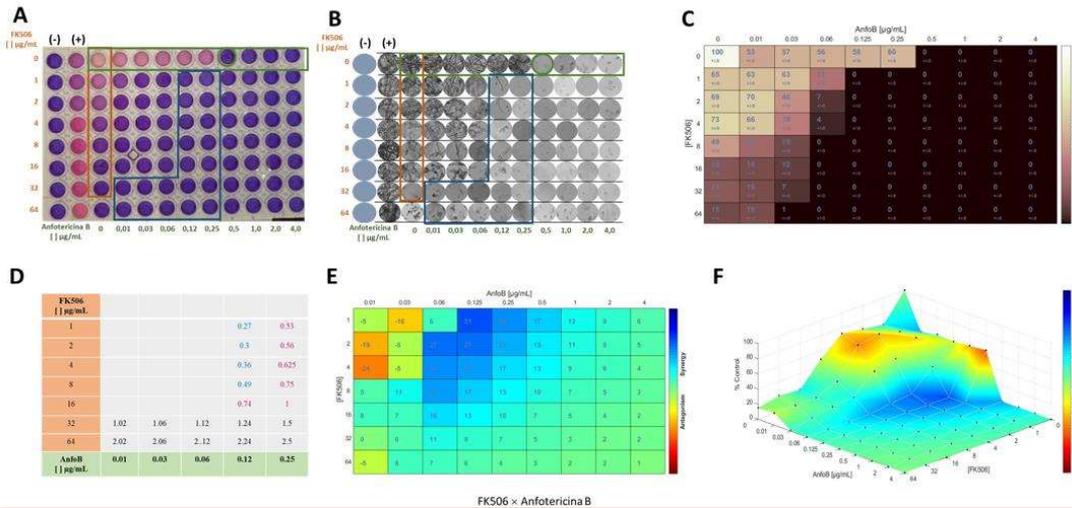


Figura 20. Resultados dos testes de interação entre as drogas FK506 e anfotericina B para o fungo *F. nubica*. **A.** Ensaio de *Checkerboard*, na primeira linha selecionada pela cor verde está a CIM de anfotericina B, selecionada pela cor vermelha na terceira coluna está a CIM de FK506, as duas primeiras colunas são os controles (positivo de crescimento e negativo de contaminação), enquanto no restante da placa estão as combinações entre as drogas. Selecionados de azul estão as interações que foram indicadas pelo programa com interação sinérgica maior que 50% para o cálculo de FICI. **B.** Visualização do crescimento fúngico através de microscopia óptica (aumento 20 \times). **C.** Matriz de crescimento em relação ao controle positivo (sem nenhuma droga). **D.** Valores do FICI para as combinações selecionadas, sendo azul indicativo de sinergismo, rosa: efeito aditivo, preto: sem interação. **E.** Representação gráfica das interações entre as drogas produzida pelo programa *Combenefit*. **F.** Representação pelo gráfico de superfície independente de *Bliss* das interações entre as drogas.

Os resultados aqui obtidos estão em consonância com os observados por Kontoyiannis e colaboradores (2008) que estudaram os efeitos de FK506 associado à anfotericina B ANFB em isolados clínicos de pacientes com criptococose. Para *C. neoformans* foi observado o predomínio de relações sinérgicas em 90% dos isolados enquanto nos outros 10% foi obtido efeito aditivo essa classificação foi feita de acordo com os cálculos de FICI. Gao e Sun (2015) puderam observar efeito sinérgico em *Aspergillus* sp. Ao utilizarem FK506 isolada não foi detectado efeito antifúngico mas ao combinar com anfotericina B detectou-se efeito sinérgico, inclusive em valores extremamente menores que as CIMs determinadas (FK506 diminuiu de 256 para 8 $\mu\text{g/mL}$ e AnfoB de 4 para 0,25 $\mu\text{g/mL}$).

O sinergismo entre essas drogas pode ser atribuído ao efeito da anfotericina B na perturbação da membrana que altera a sua permeabilidade é possível que dessa forma o FK506 consiga entrar mais facilmente e se ligar ao FKBP e formar o complexo capaz de inibir a via da calcineurina.

Após a análise desses três tipos de métodos para averiguar o desenvolvimento fungico calculou-se os valores de FICI (**Figuras 18D, 19D e 20D**) para especificar o tipo de relação existente entre as drogas em relação ao fungo. Nas três espécies foi identificado o sinergismo

entre as combinações, para *F. pedrosoi*: 0,12µg/mL de anfotericina B com 2, 4, 8 e 16 de FK506; para *F. monophora*: 0,12 µg/mL de anfotericina B com 8 e 16 µg/mL de FK506 e, para *F. nubica*: 0,06 µg/mL de anfotericina B com 8µg/mL de FK506 e 0,12µg/mL de anfotericina B com 1, 2, 4 e 8µg/mL de FK506. Em concentrações diferentes foi encontrado efeito aditivo.

Por fim, foram analisados os gráficos de interação entre as drogas (**Figuras 18E/F, 19E/F e 20E/F**) para *F. pedrosoi*. É perceptível que há predomínio de sinergismo em detrimento do antagonismo entre as drogas, mas existe também, como é esperado, combinações em que não existem interações. Ao observar as combinações que foram selecionadas para realização dos cálculos é possível determinar a existência de sinergismo, sendo que perante aos valores determinados do FICI algumas combinações são classificadas como relações aditivas e até mesmo sem interação.

Para *F. monophora* é encontrado sinergismo no gráfico, inclusive em combinações em que foram constatados crescimento fúngico tanto pela resazurina, microscopia óptica quanto pelo gráfico de porcentagem de crescimento em relação ao controle positivo, mais especificamente os tons de azul claro referentes as concentrações de 32 e 64 µg/mL de FK506 com 0,06, 0,03 e 0,01 µg/mL de anfotericina B. Os poços em que se encontra a combinação entre todas as concentrações de FK506 com 0,25µg/mL são classificados como sinergismo através dos graficos porém pelas contas de FICI são combinações com efeito aditivo (exceção 64µg/mL de FK506 e 0,25µg/mL que indica sem interação).

Em todos os ensaios de FK506 com anfotericina B foi observada a resposta dose-dependência para os três isolados estudados e foi determinado que há interação entre as drogas. Apesar de existir algumas divergências entre certas combinações em relação aos diferentes métodos utilizados, conseguiu-se identificar maior predomínio de semelhanças entre as relações. Por conseguinte foi possível classificar que esses compostos são sinérgicos para as espécies de *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica*.

Interação entre as drogas Ciclosporina A e Anfotericina B e Itraconazol para *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica*

Afim de verificar a interação entre outro inibidor da via da calcineurina junto de antifúngicos, optou-se por investigar a atuação de Ciclosporina A que inibe a via da Cna ao formar um complexo com a Ciclofilina A (Garcia *et al*, 2004). Foi analisada a sua interação em conjunto com anfotericina B e itraconazol.

Para isso foi realizado o teste de *checkerboard* para os três isolados de *Fonsecaea* e a utilização da resazurina para facilitar a identificação do crescimento dos fungos (**Figuras 21A, 22A e 23A**). Para *F. pedrosoi* (anfotericina B = 0,25 µg/mL e Ciclosporina A > 64 µg/mL) foi observada inibição do crescimento em concentrações menores que a CIM, 0,06 e 0,12 µg/mL para Anfotericina B combinadas a todas as concentrações de ciclosporina A. Ao comparar o crescimento por microscopia óptica (**Figura 21B**) foi possível concluir que há discordância entre a coloração mais escura que indica inibição do crescimento. As combinações de 0,06 µg/mL de anfotericina B associada a todas as concentrações de ciclosporina A são indicadas pela resazurina como sem crescimento fúngico, porém, ao observar microscopicamente é possível identificar a presença de hifas. É possível que essa coloração não esteja em concordância com o crescimento das hifas devido a um efeito fungicida da combinação de drogas posterior ao início do seu desenvolvimento.

Ao comparar a mesma placa pela porcentagem de redução de resazurina (**Figura 21C**), as concentrações em que a resazurina indicou a ausência de fungos ativos foram observados pouco desenvolvimento de hifas. Ao observar pelos gráficos gerados pelo método de Bliss (**Figura 21E e F**) a partir da redução de resazurina foi constatado que há sinergismo >50% entre as concentrações de 0,06 e 0,12 µg/mL de anfotericina A com todas as concentrações de ciclosporina A para o isolado de *F. pedrosoi*. Foram realizados os cálculos de FICI (**Figura 21D**) para os poços selecionados em azul na **Figura 21B** e classificou-se como existindo sinergismo entre os compostos (0,12 µg/mL de anfotericina B com 1, 2, 4, 8 e 16 µg/mL de ciclosporina) além de interações aditivas em outros poços.

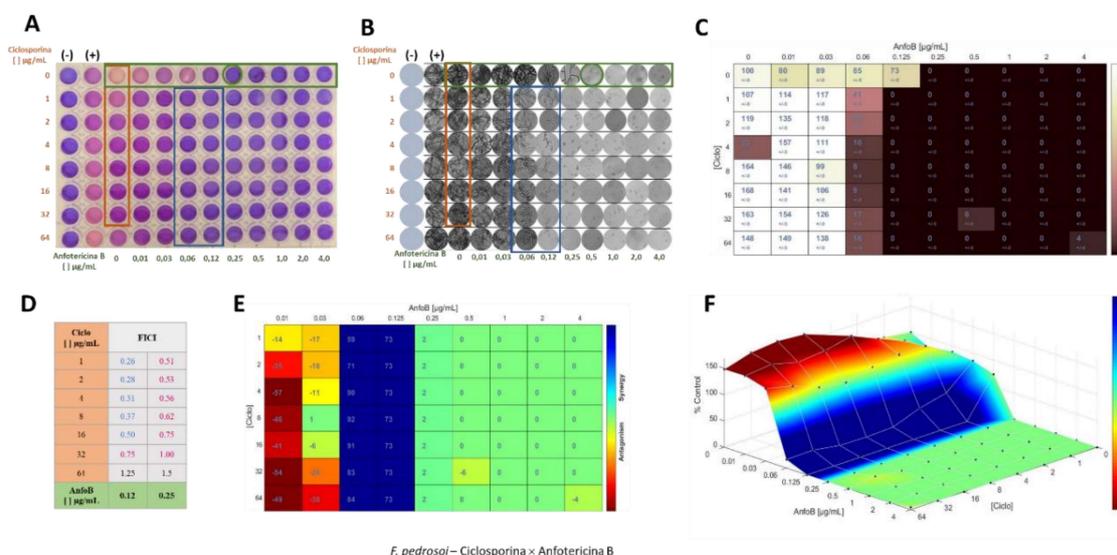


Figura 21. Interação entre as drogas ciclosporina A e anfotericina B para o fungo *F. pedrosoi*. **A.** Ensaio de *checkerboard*, na primeira linha selecionado pela cor verde está o CIM de anfotericina B, selecionado pela cor vermelha na terceira coluna está o CIM de ciclosporina A, as duas primeiras colunas são os controles (positivo de

crescimento e negativo de contaminação), enquanto no restante da placa estão as combinações entre as drogas. Selecionado de azul estão as interações que foram escolhidas para o cálculo de FICI. **B.** Visualização do crescimento fúngico do ensaio através de microscópio óptico (aumento 20×). **C.** Gráfico de crescimento em relação ao controle positivo (controle de crescimento). **D.** Valores do FICI para a região selecionada em azul no ensaio, azul: sinergismo, rosa: efeito aditivo, preto: sem interação. **E.** Representação gráfica das interações entre as drogas. **F.** Representação pelo gráfico de superfície independente de *Bliss* das interações entre as drogas.

Para o fungo *F. monophora* (CIM anfotericina B = 1 µg/mL e ciclosporina A >64 µg/mL) ao verificar o resultado do ensaio de *checkerboard* foi detectada inibição do crescimento fúngico em concentrações menores que CIM para anfotericina B em combinação com a ciclosporina A (**Figura 22A**). A inspeção e documentação microscópica foi feita e pôde-se encontrar maior semelhança entre o indicativo da resazurina com o crescimento das hifas, ainda assim, há divergências.

Os gráficos de interação pelo método de Bliss (**Figura 22E e F**) indicaram sinergismo menor que 50% na coluna das combinações entre 0,5 µg/mL de anfotericina B com ciclosporina A e maior que 50% para as combinações de 0,25 µg/mL de anfotericina B com todas concentrações de ciclosporina A (exceção à concentração de 1 µg/mL) assim, foram selecionadas as concentrações que pelo gráfico possuem sinergismo maior que 50% e realizaram-se os calculos de FICI (**Figura 22D**) para identificar a relação entre as drogas. Os valores de FICI foram indicativos de efeitos aditivos para as combinações entre 2 -32 µg/mL de ciclosporina A com 0,25 µg/mL de Anfotericina B.

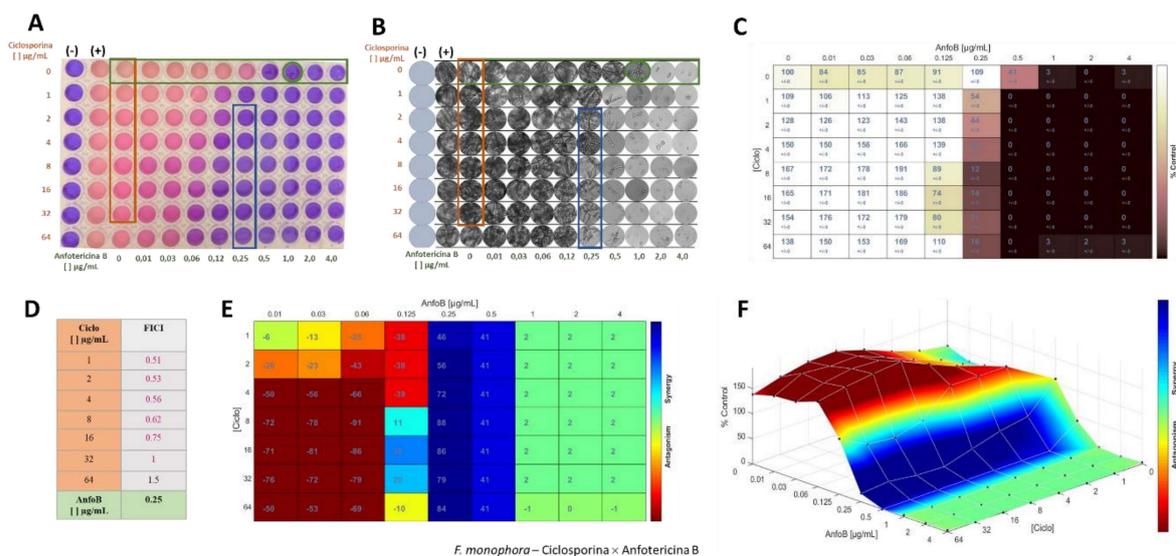


Figura 22. Interação entre as drogas ciclosporina A e anfotericina B para o fungo *F. monophora*. **A.** *Checkerboard*, na primeira linha selecionado pela cor verde está o CIM de anfotericina B, selecionado pela cor vermelha na terceira coluna está o CIM de ciclosporina A, as duas primeiras colunas são os controles (positivo de crescimento e negativo de contaminação), enquanto no restante da placa estão as combinações entre as drogas. Selecionado de

azul estão as interações que foram escolhidas para o cálculo de FICI. **B.** Visualização do crescimento fúngico do ensaio através de microscópio óptico (aumento 20×). **C.** Gráfico de crescimento em relação ao controle positivo (controle de crescimento). **D.** Valores do FICI para a região selecionada em azul no ensaio, azul: sinergismo, rosa: efeito aditivo, preto: sem interação. **E.** Representação gráfica das interações entre as drogas. **F.** Representação pelo gráfico de superfície independente de *Bliss* das interações entre as drogas.

Ao verificar a combinação de drogas para *F. nubica* (Ciclosporina A > 64 µg/mL e Anfotericina B = 0,12 µg/mL) foi encontrado que há inibição do crescimento de acordo com a indicação de oxido-redução de resazurina na maior parte da placa de *checkerboard* (**Figura 23A**). Quando a inspeção microscópica foi realizada, percebeu-se grande concordância entre o crescimento fúngico e a coloração da resazurina (**Figura 23B**). Para determinação da CIM para anfotericina B observou-se coloração roxo azulada nos poços contendo concentrações maiores que 0,12 µg/mL de anfotericina B, porém a ausência de hifas só foi detectada em concentrações maiores que 0,5 µg/mL.

Os gráficos de interação entre as drogas obtidos pelo método de Bliss foram construídos (**Figura 23E e F**) e para a concentração de 0,06 µg/mL de anfotericina B associada a todas as concentrações de ciclosporina A foi acusado sinergismo acima de 50%. Essas combinações foram selecionadas, juntamente com aquelas em que havia 0,12 e 0,25 µg/mL de anfotericina B e calculou-se o valor de FICI para cada condição (**figura 23D**). Para as concentrações de 0,06 µg/mL de anfotericina B com as concentrações de ciclosporina A de 16 a 1 µg/mL de ciclosporina A, o efeito sinérgico foi determinado, embora pela microscopia observa-se a presença de hifas nos poços. Já para a combinação de 0,12 µg/mL de anfotericina B e 16 a 1 µg/mL de ciclosporina A observou-se valores de FICI < 0,5, além de ausência de hifas nos poços.

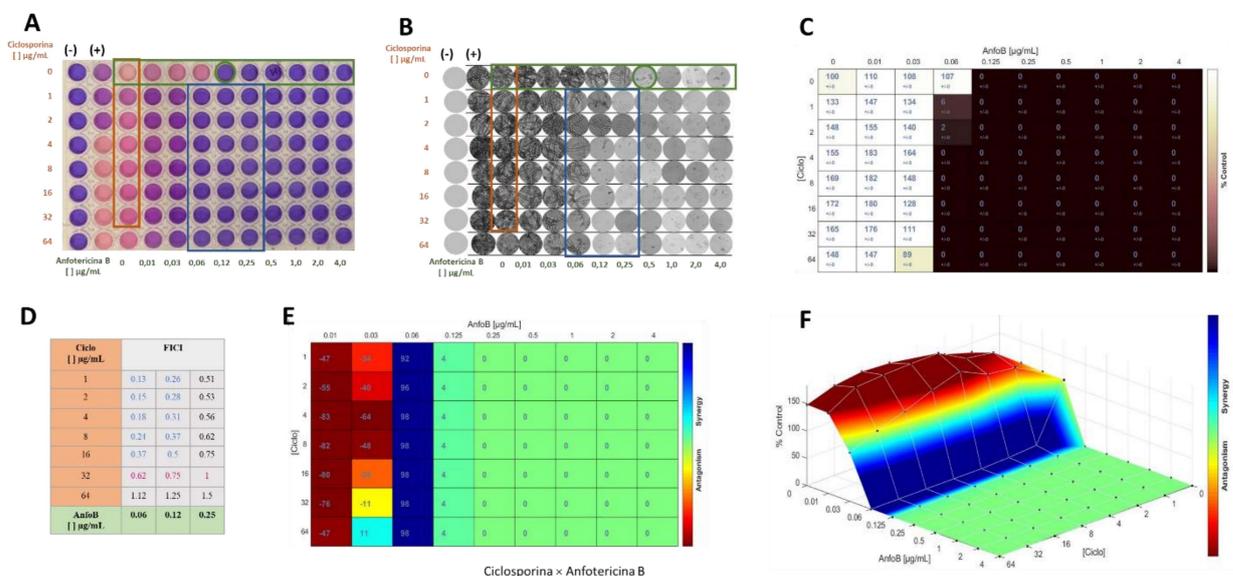


Figura 23. Interação entre as drogas ciclosporina A e anfotericina B para o fungo *F. nubica*. **A.** *Checkerboard*, na primeira linha selecionado pela cor verde está o CIM de anfotericina B, selecionado pela cor vermelha na terceira coluna está o CIM de ciclosporina A, as duas primeiras colunas são os controles (positivo de crescimento e negativo de contaminação), enquanto no restante da placa estão as combinações entre as drogas. Selecionado de azul estão as interações que foram escolhidas para o cálculo de FICI. **B.** Visualização do crescimento fúngico do ensaio através de microscópio óptico (aumento 20×). **C.** Gráfico de crescimento em relação ao controle positivo (controle de crescimento). **D.** valores do FICI para a região selecionada em azul no ensaio, azul: sinergismo, rosa: efeito aditivo, preto: sem interação. **E.** Representação gráfica das interações entre as drogas. **F.** Representação pelo gráfico de superfície independente de *Bliss* das interações entre as drogas.

A combinação de anfotericina B com ciclosporina A já foi estudada por outros pesquisadores. Mo e colaboradores (2014) ao analisarem a combinação entre anfotericina B com ciclosporina A conseguiram observar sinergismo em 85% dos isolados clínicos de *Talaromyces marneffe*, além da diminuição da CIM para as duas drogas em combinação. Também foi visto esse tipo de interação para *C. neoformans* e foi encontrado maior número de combinações sinérgicas (89%) que interações aditivas (11%) para esse fungo, inclusive foram testados *in vivo* essas combinações nos pacientes que já estavam em tratamento com ciclosporina A para imunossupressão após transplante de órgãos e possuíam infecção por esse fungo. Desses pacientes observou-se sobrevivência de 100%, indicando uma boa opção terapêutica (Kontoyiannis *et al*, 2008). Rossato e colaboradores (2020) estudaram os efeitos de inibidores da via da Cna em conjunto com antifúngicos para *C. neoformans* e encontraram 90% de sinergismo para os isolados analisados e 10% apresentaram efeito aditivo.

Apesar das divergências encontradas entre os métodos de análise de interações, as similaridades entre eles foi superior para os três isolados clínicos de *Fonsecaea* em relação a interação entre ciclosporina A e anfotericina B. Foi observado que existem combinações de drogas que promovem efeito sinérgico para *F. monophora* e *F. pedrosoi*, e, além de interações aditivas que também podem ser exploradas.

A alteração na permeabilidade da membrana provocada pela Anfotericina B que interage com o ergosterol presente na membrana celular do fungo, parece ser o principal fator que favorece o sinergismo, facilitando o influxo de ciclosporina A que forma um complexo com a ciclofilina A e consegue inibir a via da Cna, e conseqüentemente afetando o crescimento do fungo.

A interação entre ciclosporina A com itraconazol para os isolados testados também foi verificada. Para *F. pedrosoi* (CIM itraconazol = 0,06 µg/mL e ciclosporina >64 µg/mL) Os gráficos de crescimento em relação ao controle positivo e de interação entre as drogas pelo método de *Bliss* (**Figura 24**) foram construídos pelo programa *Combeneft* e pela sua avaliação é possível interpretar que em todas as concentrações de ciclosporina A com itraconazol acima da sua CIM possuem bloqueio do crescimento fúngico. Assim, não foi observada inibição do

desenvolvimento do fungo em concentrações menores que a CIM combinadas indicando a ausência de sinergismo ou efeito aditivo entre as drogas. Como não foi demonstrado sinergismo maior que 50% entre as combinações, não foi realizado o cálculo de FICI para as combinações desse ensaio. Porém, foi acusado antagonismo entre as concentrações de 0,01 e 0,03 $\mu\text{g/mL}$ de itraconazol com todas as de ciclosporina A.

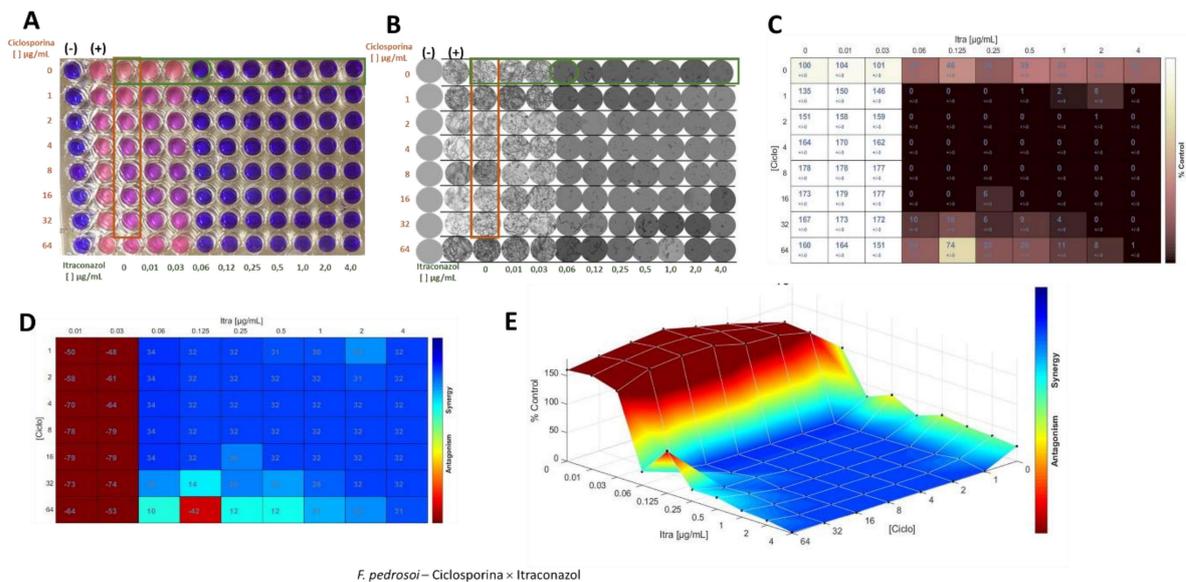


Figura 24. Interação entre as drogas ciclosporina A e itraconazol para o fungo *F. pedrosoi*. **A.** *Checkerboard*, na primeira linha selecionado pela cor verde está o CIM de itraconazol, selecionado pela cor vermelha na terceira coluna está o CIM de ciclosporina A, as duas primeiras colunas são os controles (positivo de crescimento e negativo de contaminação), enquanto no restante da placa estão as combinações entre as drogas. Selecionado de azul estão as interações que foram escolhidas para o cálculo de FICI. **B.** Visualização do crescimento fúngico do ensaio através de microscópio óptico (aumento 20 \times). **C.** Gráfico de crescimento em relação ao controle positivo (controle de crescimento). **D.** Representação gráfica das interações entre as drogas. **E.** Representação pelo gráfico de superfície independente de *Bliss* das interações entre as drogas.

Para *F. monophora* (itraconazol = 0,12 $\mu\text{g/mL}$ e ciclosporina > 64 $\mu\text{g/mL}$) foi avaliada a combinação entre ciclosporina e itraconazol pelo *checkerboard* (**Figura 25A**). Pelos gráficos foi verificado que não há interação sinérgica entre as drogas utilizadas. De acordo com esse ensaio foi observado que em valores abaixo da CIM de itraconazol (<0,12 $\mu\text{g/mL}$) com todas as concentrações de ciclosporina A há o aparecimento da cor rosa, indicando células fúngicas metabolicamente ativas. Foi feita a inspeção microscópica (**Figura 25B**), a qual é possível encontrar correlação direta entre as cores rosadas e presença de hifas, sem existir variações entre esses dois.

O gráfico de redução da resazurina em relação ao controle positivo (**Figura 25C**) está em sintonia com os achados anteriores, onde não foi detectado inibição do crescimento em concentrações menores que a CIM das drogas utilizadas. A fim de averiguar se existe algum tipo de relação entre as combinações das drogas para *F. monophora* os gráficos de interação de *Bliss* foram contruídos pelo programa *CombeneFit* (**Figuras 25 D e E**) através deles foi mostrado que realmente não existem interações sinérgicas maiores que 50% em concentrações menores que a CIMs dos compostos utilizados. Combinações antagônicas entre todas as concentrações de Ciclosporina A com 0,01, 0,03 e 0,06 $\mu\text{g/mL}$ de itraconazol foram evidenciadas.

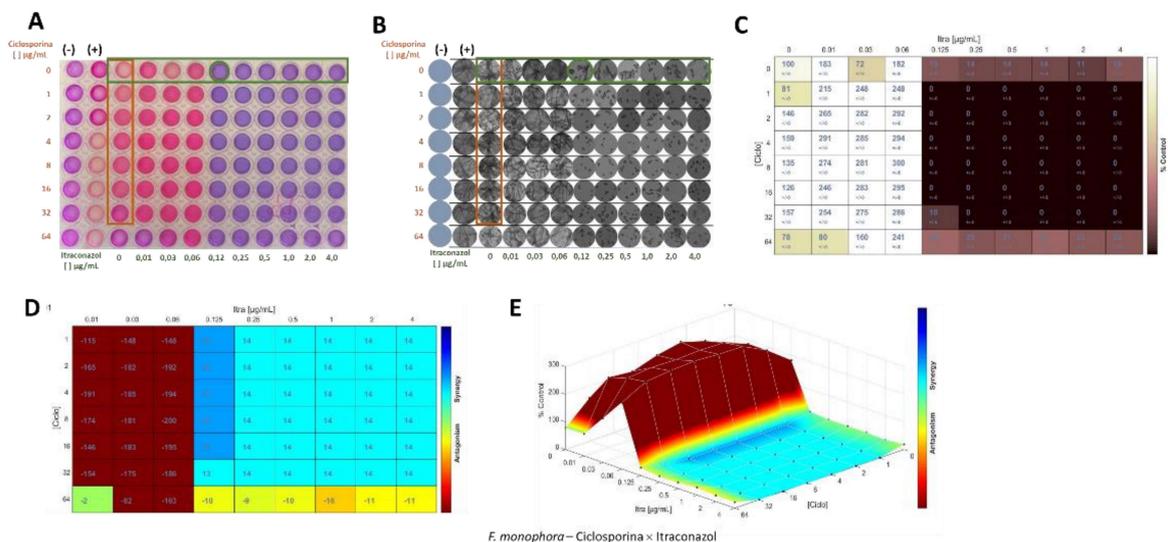


Figura 25. Interação entre as drogas ciclosporina A e itraconazol para o fungo *F. monophora*. **A.** *Checkerboard*, na primeira linha selecionado pela cor verde está o CIM de itraconazol, selecionado pela cor vermelha na terceira coluna está o CIM de ciclosporina A, as duas primeiras colunas são os controles (positivo de crescimento e negativo de contaminação), enquanto no restante da placa estão as combinações entre as drogas. Selecionado de azul estão as interações que foram escolhidas para o cálculo de FICI. **B.** Visualização do crescimento fúngico do ensaio através de microscópio óptico (aumento 20 \times). **C.** Gráfico de crescimento em relação ao controle positivo (controle de crescimento). **D.** Representação gráfica das interações entre as drogas. **E.** Representação pelo gráfico de superfície independente de *Bliss* das interações entre as drogas.

Para *F. nubica* (CIM Itraconazol = 0,12 $\mu\text{g/mL}$ e ciclosporina A > 64 $\mu\text{g/mL}$) o teste de *checkerboard* (**Figura 26**) foi verificado através do gráfico de crescimento (**Figura 26C**) que em toda a placa há inibição do crescimento, porém, apenas nos poços contendo concentração de itraconazol maior ou igual a 0,12 $\mu\text{g/mL}$ que ocorreu diminuição do crescimento das hifas. Foram construídos os gráficos de *Bliss* (**26D e E**) e eles indicaram não existir interação entre as drogas combinadas, assim não houve em nenhuma dessas concentrações utilizadas sinérgismo maior que 50% ou menor para ser analisado através do FICI.

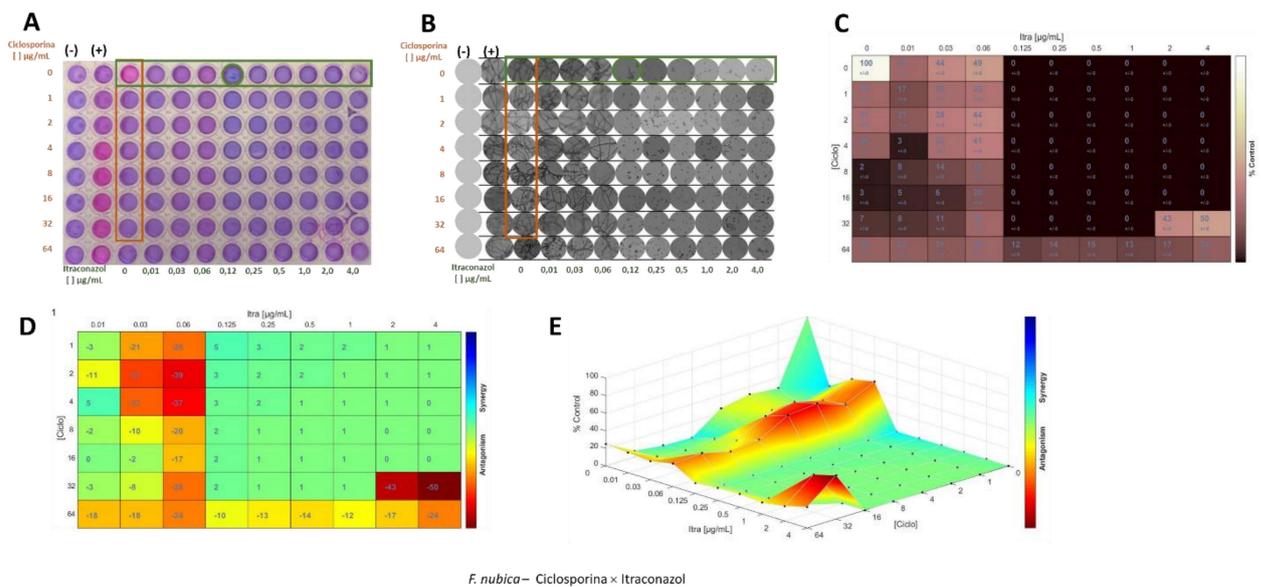


Figura 26. Interação (*checkerboard*) entre as drogas ciclosporina A e itraconazol para o fungo *F. nubica*. **A.** *Checkerboard*, na primeira linha selecionado pela cor verde está o CIM de itraconazol, selecionado pela cor vermelha na terceira coluna está o CIM de ciclosporina A, as duas primeiras colunas são os controles (positivo de crescimento e negativo de contaminação), enquanto no restante da placa estão as combinações entre as drogas. Selecionado de azul estão as interações que foram escolhidas para o cálculo de FICI. **B.** Visualização do crescimento fúngico do ensaio através de microscópio óptico (aumento 20×). **C.** Gráfico de crescimento em relação ao controle positivo (controle de crescimento). **D.** Representação gráfica das interações entre as drogas. **E.** Representação pelo gráfico de superfície independente de *Bliss* das interações entre as drogas.

A interação entre itraconazol com ciclosporina A foi observada por Mo e colaboradores (2014) para *T. marneffei* onde foi verificado sinergismo para 65% dos isolados clínicos testados. O Sinergismo entre esses compostos também foi verificado para 70% dos isolados clínicos de *R. oryzae*, *Mycocladius corymbiferus*, *M. circinelloides*, *Rhizopus microsporus* e *Rhizomucor pusillus* por Dannaoui e seu grupo (2009). Para *F. nubica* não foi encontrado nenhum tipo de interação entre as combinações de Itraconazol com Ciclosporina A, enquanto para *F. monophora* e *F. pedrosoi* foi encontrado antagonismo nas concentrações mais baixas de itraconazol com todas as concentrações de ciclosporina A.

5. Conclusões e perspectivas

Variados tipos de interações foram apresentados pelas combinações das drogas inibidoras da via da calcineurina em conjunto com os antifúngicos testados nesse trabalho. A utilização de FK506 com Itraconazol apresentou –se promissora uma vez que para os isolados de *Fonsecaea* testados observou-se efeito aditivo ou sinérgico entre concentrações menores que seus valores de CIMs determinados.

Foi identificado o sinergismo entre as combinações para *F. pedrosoi* (2 µg/mL para FK506 com 0,06 µg/mL de itraconazol) e *F. monophora* (16 µg/mL de FK506 com 0,06 µg/mL de itraconazol), enquanto para *F. nubica* não foi observado esse tipo de relação entre as drogas. O mesmo ocorreu na interação entre Ciclosporina A com Anfotericina B, porém para *F. monophora* essa combinação que não apresentou efeito sinérgico, mas aditivo. Para *F. pedrosoi* a concentração sinérgica de menor valor foi 1 µg/mL de ciclosporina A com 0,12 µg/mL de anfotericina B e para *F. nubica* foi 1 µg/mL de ciclosporina A com 0,06 µg/mL de anfotericina B.

Ao verificar a associação entre FK506 e Anfotericina B pode-se concluir que existe sinergismo além de efeito aditivo para todas as espécies (*F. pedrosoi* 2 µg/mL de FK506 com 0,12 µg/mL de anfotericina B, *F. monophora*: 4 µg/mL de FK506 com 0,12 µg/mL de anfotericina B e *F. nubica*: 8 µg/mL de FK506 com 0,06 µg/mL de anfotericina B), porém, ao averiguar o tipo de interação entre ciclosporina A com Itraconazol não foi possível detectar efeito sinérgico ou aditivo para *F. nubica*, *F. pedrosoi*, e *F. monophora*, sendo identificado antagonismo entre essas drogas para *F. pedrosoi* e *F. monophora*. Em todas as interações, porém, independente do agente patogênico, foi verificado a dose-dependência dos mesmos para os compostos analisados.

Em relação ao possível envolvimento da melanina na resistência de *Fonsecaea* aos inibidores de calcineurina foi observado que não houve efeito significativo na diminuição das CIMs de FK506 e ciclosporina A.

Os resultados apresentados variam de acordo com o isolado clínico da espécie, talvez, ao aumentar o número de isolados testados teria resultados mais precisos sobre as interações entre as drogas inibidoras da via da Cna poderiam ser obtidos. Outro ponto importante é o fato de que as drogas foram analisadas em relação a morfologia de hifa dos fungos e não na forma patogênica (células muriformes), encontrada dentro das lesões no hospedeiro. Essas células são mais difíceis de se obter *in vitro* por isso não foram utilizadas no presente trabalho. Como essas células são mais resistentes possivelmente o padrão de susceptibilidade às drogas testadas pode ser distinto do detectado neste trabalho. A avaliação dos efeitos das drogas nas células muriformes é indicada, visto que, por serem mais resistentes ao sistema imune do hospedeiro talvez sejam necessárias concentrações mais elevadas das drogas aqui analisadas para se observar um efeito fungicida.

Por fim, a falta de terapias mais acessíveis e eficientes para o tratamento de pacientes com CBM urge a necessidade de identificar novas opções terapêuticas para a população que

sofre com essa doença. Os resultados aqui encontrados sugerem que a utilização desses compostos inibidores da via da calcineurina ou de outras moléculas desenhadas especificamente para fungos que atuem nesta via, ao serem combinados com antifúngicos podem ser uma opção viável, pois foi verificado efeito sinérgico e aditivo entre eles, principalmente em relação ao FK506. Abre-se uma nova frente para os estudos *in vivo* sobre os efeitos que essas interações possam apresentar em pacientes com cromoblastomicose causada pelos fungos do gênero *Fonsecaea* tornando as associações entre inibidores da via da calcineurina com antifúngicos uma estratégia atrativa a ser explorada para o tratamento dessa doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALSHAHNI, M. *Et al.* Genetic and phenotypic analyses of calcineurin A subunit in *Arthroderma vanbreuseghemii*. *Medical Mycology*. Vol. 54. Pgs. 207-218. 2006.
2. AMEEN, M. Chromoblastomycosis: Clinical presentation and management. *Clinical and experimental dermatology*. Vol. 34. Pgs. 849-854. 2009.
3. ANDRADE, T. *Et al* Suscetibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses*. Vol. 47. Pgs. 216-221. 2004.
4. ANDRADE, T. *Et al.* Chromoblastomycosis in the Amazon region, Brazil, caused by *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea nubica*, and *Rhinocladiella similis*: clinicopathology, susceptibility, and molecular identification. *Medical mycology*. Vol. 58. Pgs. 172-180. 2020.
5. ANDRADE, T. *Et al.* Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses*. Vol. 47. Pgs. 216-221. 2004.
6. ARBOLEDA, W. A. L. Variabilidade genética e avaliação de sensibilidade a fungicidas em *Sclerotinia sclerotiorum* proveniente de cultivo irrigado de feijoeiro. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 54 pgs. 2015.
7. ARIKAN, S. *et al.* In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium spp.* *Antimicrobial agentes and chemotherapy*. Vol 46, pgs. 245 – 247. 2002.
8. BADALI, H. *Et al.* Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* and *F. Monophora* in Cuba. *Mycopathologia*. Vol. 175. Pgs. 439-444. 2013.
9. Ban Y. *Et al* Characterization of FK506 Biosynthetic Intermediates Involved in Post-PKS Elaboration. *J. Nat. Prod.* Vol. 76. Pgs. 1091–1098. 2013.
10. BAN, Y. *Et al.* Characterization of FK506 biosynthetic intermediates involved in post-PKS elaboration. *Journal of Natural products*. Vol. 76. Pgs. 1091-1098. 2013.
11. BEDOUT, C. *Et al.* In vitro suscetiptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. Vol. 39. Pgs. 145-148. 1997.
12. BEOM, J. *Et al.* Biosynthesis of nonimmunosuppressive FK506 analogues with antifungal activity. *Journal of natural products*. Vol. 82. Pgs. 2078-2086. 2019.
13. BIANCALANA, F. *Et al.* In vitro evaluation of the type of interaction obtained by the combination of terbinafine and itraconazole, voriconazole,, or amphotericin B against dematiaceous molds. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol. 55. Pgs. 4485-4487. 2011.
14. BONIFAZ, A. *et al.* Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycosis*. V 44, pgs. 1-7. 2001.
15. BORBA-SANTOS, L. *Et al.* Tacrolimus increases the effectiveness of itraconazole and fluconazole against *Sporothrix spp.* *Frontier in microbiology* . Vol. 8. Pgs. 1-9. 2017.
16. BRITO, A. C. BITTENCOURT, M. J. S. Chromoblastomycosis: an etiological, epidemiological, clinical, diagnostic and treatment update. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. V. 93, pgs. 495-506. Abril, 2018.
17. CAI, L., *et al.* Frequency-modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation. *Nature*. v. 455. pgs. 485–490, 2008.
18. CALIGIORNE, R. *et al.* In vitro susceptibility of chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis agentes to antifungal drugs. *Medical mycology*. Vol. 37. Pgs. 405-409. 1999.

19. CAO, Y. *Et al.* Calcineurin modulates growth, stress tolerance, and virulence in *Metarhizium acridum* and its regulatory network. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 98. Pgs. 8253-8265. 2014.
20. CARDONA-CASTRO, N. *Et al.* Chromoblastomycosis murine model and in vitro test to evaluate the sensitivity of *Fonsecaea pedrosoi* to ketoconazole, itraconazole and saperconazole. *Memorias do instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 91. Pgs. 779-784. 1996.
21. COELHO, R. *Et al.* Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of clinical strains of *Fonsecaea spp.* Isolated from patients with chromoblastomycosis in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*. Vol. 12. Pgs. 1-15. 2018.
22. COELHO, R. *et al.* Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of clinical strains of *Fonsecaea spp.* isolated from patients with chromoblastomycosis in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. V.12, pg 7, 2018.
23. CRABTREE, G. SCHREIBER, S. SnapShot: Ca²⁺ calcineurin-NFAT signaling. *Cell*. vol. 138 (1), pgs. 210–210, .2009.
24. CRAMER, R. *Et al.* Calcineurin target CrzA regulates conidial germination, hyphal growth, and pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, vol. 7. Pgs. 1085-1097. 2008.
25. DANNAOUI, E. *Et al.* In Vitro Interactions between Antifungals and Immunosuppressive Drugs against Zygomycetes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol. 53. N° 8. Pgs. 3549–3551. Agosto. 2009.
26. DE HOOG, G. *Et al.* Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. *Medical mycology*. Vol. 44, pgs. 405-416. 2004.
27. DEBOIT, T., *et al.* A Case of Relapsed Chromoblastomycosis Due to *Fonsecaea monophora*: Antifungal Susceptibility and Phylogenetic Analysis. *Mycopathologia*. v.176, pgs. 139–144, 2013.
28. DENG, S. *Et al.* Combination of amphotericin B and terbinafine against melanized fungi associated with chromoblastomycosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol. 62. Pgs. 1-7. 2018.
29. DENG, S. *Et al.* Combination of Amphotericin B and Terbinafine against Melanized Fungi Associated with Chromoblastomycosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol. 62. Edição 00270. 2018
30. ESTERRE, P. *et al.* Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Current Opinion in Infectious Diseases*. V.19, pgs. 148-152. 2006.
31. ESTERRE, P. *et al.* Treatment of chromomycosis with terbinafine: preliminary results of an open pilot study. *Br J Dermatol* V. 46, pgs. 33-36, 1996.
32. FARBIARZ, S. *Et al.* Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells in vitro. *Medical mycology*. Vol. 30. Pgs. 265-273. 1992.
33. FERREIRA, M. *Et al.* Functional characterization of *Aspergillus fumigatus* calcineurin. *Fungal genetics and biology*. Vol. 44. Pgs. 219-230. 2007.
34. FLORENCIO C.S., *et al.* Genetic manipulation of *Fonsecaea pedrosoi* using particles bombardment and Agrobacterium mediated transformation. *Microbiological Research*. v. 207, p. 269–279, 2018.
35. GAO, L. SUN, Y. In vitro interactions of antifungal agents and tacrolimus against *Aspergillus* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol. 59. Pgs. 7097-7099. 2015.
36. GUPTA, A. *et al.* Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil, *Medical Mycology*, V. 40, ed. 5, Pgs. 529–534, 2002.

37. HAMILL, R. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs*. V. 73, pgs. 919-934. Jun. 2013.
38. HAREL, A. *Et al.* Calcineurin is required for sclerotial development and pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* in an oxalic acid-independent manner. *Molecular plant-microbe interactions*. Vol. 19. Pgs. 682-693. 2006.
39. HAY, R. *Et al.* The diagnosis of fungal neglected tropical diseases (fungal NTDs) and the role of investigation and laboratory tests : an expert consensus report. *Tropical medicine and infectious disease*. Vol. 4. 2019.
40. HAYAKAWA, M. *Et al.* Phagocytosis, production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines by macrophages in the presence of dematiaceous fungi that causes chromoblastomycosis. *Scandinavian journal of immunology*. Vol. 64. Pgs. 382-387. 2006.
41. HELLWIG, A. *Et al.* In vitro susceptibility of chromoblastomycosis agents to antifungal drugs: a systematic review. *Journal of global antimicrobial resistance*. Vol. 16. Pgs. 108-114. 2019.
42. HU, Y. *Et al.* Photodynamic therapy combined with antifungal drugs against chromoblastomycosis and the effect of ALA-PDT on *Fonsecaea* in vitro. *PLoS Negl. Trop. Dis.* Vol. 13. Outubro. Edição 0007849. 2019.
43. JUVVADI, P. *Et al.* Calcineurin in fungal virulence and drug resistance: prospects for harnessing targeted inhibition of calcineurin for an antifungal therapeutic approach. Vol 8. Pgs. 186-197. 2017.
44. JUVVADI, P. *et al.* Calcineurin localizes to the hyphal and septum in *Aspergillus fumigatus*: implications for septum formation and conidióforo development. *Eukaryotic cell*, Vol 7, pgs. 1606 – 1610. 2008.
45. JUVVADI, P. *Et al.* FKBP12 dimerization mutations effect FK506 binding and differentially alter calcineurin inhibition in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Biochemical and biophysical research communication*. Vol. 526. Pgs. 48-54. 2020.
46. JUVVADI, P. *Et al.* Phosphorylation of calcineurin at a novel serine-proline rich region orchastrates hyphal growth and virulance in *Aspergillus fumigatus*. *PloS pathogens*. Vol. 9. 2013.
47. KHAN, S. *Et al.* Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* : an old wine in a rare bottle. *Journal of infection in developing countries*. Vol. 9. Pgs. 325-329. 2015.
48. KÖHLER J. *Et al.* Fungi that infect humans. *Microbiol Spectr*. Junhi. Vol. 5 (3). 2017.
49. KOHLER, A. *et al.* Melanin and chromoblastomycosis agents: Characterization, functions, and relation with antifungals. *Journal of Basic Microbiology*. Vol. 61. Pgs. 203-211. Dezembro. 2020.
50. KONTOYIANNIS, D. *Et al.* Calcineurin inhibitor agents interact synergistically with antifungal agents in vitro against *Cryptococcus neoformans* isolates: correlation with outcome in solid organ transplant recipients with cryptococcosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol. 52. Pgs. 735-738. 2008.
51. KRZYSCIĄK, P. M. *et al.* Chromoblastomycosis. *Postępy Dermatologii i Alergologii* V. 5, pgs. 310 – 321. Out. 2014.
52. KUBIÇA, T. *Et al.* Antifungal activities of tacrolimus in combination with antifungal agents against fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Trichosporon asahii* isolates. *Brazilian journal of infvtious diseases*. Vol. 20. Pgs. 539-545. 2016.
53. KUMARASINGHE, S. KUMARASINGHE, M. Itraconazole pulse therapy in chromoblastomycosis. *Eur J Dermatol*. V10, pgs. 220-222. 2000.
54. LEE Y. *et al.* In vitro and in vivo assessment of FK506 analogs as novel antifungal drug candidates. *Antimicrob Agents Chemother*. Vol. 62. Edição 01627. N°18. 2018.

55. LEE, S. *Et al.* Calcineurin orchestrates dimorphic transitions, antifungal drug responses and host-pathogen interactions of the pathogenic mucoralean fungus *Mucor circinelloides*. *Molecular Microbiology*. Vol. 97. Pgs. 844-865. 2015.
56. LEE, S. *Et al.* Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PloS pathogens*. Vol. 9. 2013.
57. LEWIS, R. *Et al.* Tacrolimus enhances the potency of posocanazole against *Rhizopus oryzae* in vitro and in an experimental model of mucormycosis. *Journal of infectious diseases*. Vol. 207. Pgs. 834-841. 2013.
58. LI, F. *Et al.* The role of three calcineurin subunits and a related transcription factor (Crz1) in conidiation, multistress tolerance and virulence in *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 99. Pgs. 827-840. 2015.
59. LI, Y. *Et al.* In vitro interaction between azoles and cyclosporin A against clinical isolates of *Candida albicans* determined by checkerboard method and time-kill curves. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. Vol. 61. Pgs. 577-585. 2008.
60. LIVERTOX: Clinical and Research Information on Drug Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Itraconazole. Maio, 2017.
61. LIVERTOX: Clinical and Research Information on Drug Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Fluconazole. Maio, 2012.
62. LIVERTOX: Clinical and Research Information on Drug Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Terbinafine. Jan. 2018.
63. MARCHETTI, O. *Et al.* Potente synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol. 44. Pgs. 2373-2381. 2000.
64. MARTINEZ, R. MÉNDEZ, L. Chromoblastomycosis. *Clinics in dermatology*. Vol. 25. Pgs. 188-194. 2007.
65. Mesa-Arango A, et al. It only takes one to do many Jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontier Microbiology*. Vol 3. Agosto. 2012.
66. MO, D. *Et al.* In vitro interactions of calcineurin inhibitors with conventional antifungal agents against the yeast form of *Penicillium marneffei*. *Mycopathologia*. Vol. 178. Pgs. 217-220. 2014.
67. MONTEIRO, M. C. *Et al.* A new approach to drug Discovery: High-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. *Journal of Biomolecular Screening*. Vol. 17. Pgs. 542-549. 2012.
68. NAJAFZADEH, M. *Et al.* In vitro activities of eight antifungal drugs against 55 isolates of *Fonsecaea spp.* *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol. 54. Pgs. 1636-1638. 2010.
69. NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos fungos filamentosos: Norma Aprovada. Norma M38-A do NCCLS (ISBN 1-56238-470-8). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.
70. ODOM A. et al The Immunosuppressant FK506 and Its Nonimmunosuppressive Analog L-685,818 Are Toxic to *Cryptococcus neoformans* by Inhibition of a Common Target Protein. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol. 41. N°1. Janeiro. 1997.
71. ODOM, A. *Et al.* The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analogues L-685,818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol. 41. Pgs. 156-161. 1997.

72. ONYEWU, C. *Et al.* Targeting the calcineurin pathway enhances ergosterol biosynthesis inhibitors against *Trichophyton mentagrophytes* in vitro and in a human skin infection model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol. 51. Pgs. 3743-3746. 2007.
73. OZAWA, H. *Et al.* Antifungal activities of the combination of tacrolimus and itraconazole against *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Veterinary Medical Science*. Vol. 67. Pgs. 629-630. 2005.
74. PINTO, L. *Et al.* Melanin particles isolated from the fungus *Fonsecaea pedrosoi* activates the human complement system. Vol. 113. Pgs. 1-8. 2018.
75. PROKISCH, H. *Et al.* Impairment of calcineurin function in *Neurospora crassa* reveals its essential role in hyphal growth, morphology and maintenance of the apical Ca²⁺ gradient. *Molecular and General Genetics*. Vol. 256. Pgs. 104-114. 1997.
76. QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Medical Mycology*. V. 47, pgs. 3-15. Fev. 2009.
77. RAMBALI, B. *et al.* Susceptibility testing of pathogenic fungi with itraconazole : a process analysis of test variables. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 48. Pgs. 163-177. 2001.
78. REPP, K. *Et al.* Microplate alamar blues assay for susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Medical Mycology*. Novembro. Vol. 45. Pgs. 603-607. 2007.
79. ROBONG, R. *Et al.* Polyhexamethylene biguanide and calcineurin inhibitors as a novel antifungal treatments for *Aspergillus keratitis*. *Investigative ophthalmology and visual science*. Vol. 52. Pgs. 7309-7315. 2011.
80. RODRIGUES-VENDRAMINI F.A.V. *et al.* Antifungal activity of two oxadiazole compounds for the paracoccidioidomycosis treatment. *PLoS Neglected Tropical Disease*. Vol. 13(6) : e0007441. 2019
81. ROJAS, C. *Et al.* Phenotypic and molecular identification of *Fonsecaea pedrosoi* strains isolated from chromoblastomycosis patients in Mexico and Venezuela. *Mycoses*. Vol. 58. Pgs. 267-272. 2015.
82. ROSSATO, L. *Et al.* In vitro activity of immunosuppressive agents against *Cryptococcus neoformans*. e *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2020.
83. RUDOLPH, M. Über die brasilianische "Figueira" (Vorläufige Mitteilung). *Arch Schiffs Tropen-Hyg*, v. 18, p. 498-9, 1914.
84. SANTOS, A. *Et al.* Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS microbiology reviews*. Vol. 31. Pgs. 570-591. 2007.
85. SANTOS, D., *et al.* The global burden of chromoblastomycosis. *PLoS Negl Trop Dis*. Vol. 15. Agosto. Edição 0009611. 2021.
86. SCHNEIDER, G.X., A. *et al.* New Molecular Markers Distinguishing *Fonsecaea* Agents of Chromoblastomycosis. *Mycopathologia* v.184, pgs. 493-504, 2019.
87. SEYEDMOUSAVI, S. *Et al.* Black yeasts and their filamentous relatives : principles of pathogenesis and host defense. *Clinical microbiology reviews*. Vol. 27. Pgs. 527-542. 2014.
88. SHINDE, P. *Et al.* A non-immunosuppressive FK506 analogue with neurogenerative activity produced from a genetically engineered *Streptomyces* strain. *RSC advances*. Vol. 5. Pgs.6823-6828. 2015.
89. SHIRAZI, F. KONTTOYIANNIS, D. The calcineurin pathway inhibitor tacrolimus enhances in vitro activity of azoles against Mucorales via apoptosis. *Eukaryotic cell*. Vol. 12. Pgs. 1225-1234. 2013.

90. SIGIURA, R. *et al.* Calcineurin phosphatase in signal transduction: lessons from fission yeast. *Genes to Cells*, pgs. 619–627, Julho, 2002.
91. SIQUEIRA, I. *et al.* Early immune response against *Fonsecaea pedrosoi* requires Dectin-2-mediated Th17 activity, whereas Th1 response aided by Treg cells, is crucial for fungal clearance in later stage of experimental chromoblastomycosis. *PloS Negl tropical disease*. Vol 14 (6). Ed. 000830. 2020.
92. STEINBACH, W. *Et al.* Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic cell*. Vol. 5. Pgs. 1091-1103. 2006.
93. STEINBACH, W. *Et al.* Calcineurin inhibition or mutation enhances cell wall inhibitors against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol. 51. Pgs. 2979-2981. 2007.
94. STEINBACH, W. *Et al.* Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. *Nature Reviews Microbiology*. Vol. 5. Pgs. 418-430. 2007.
95. STEINBACH, W., *et al.* Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. *Nat Rev Microbiol*, v.5, pgs. 418–430, 2007.
96. TORRES-GUERREIRO, E. *Et al.* Chromoblastomycosis. *Clinics in dermatology*. Vol. 30. Ogs. 403-408. 2012.
97. TSAI, H. CHUNG, K. Calcineurin phosphatase and phospholipase C are required for developmental and pathological functions in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Mycobiology (United Kingdom)*. Vol. 160. Pgs. 1453-1465. 2014.
98. TWAROG, N R. *et al.* A critical evaluation of methods to interpret drug combinations. *Scientific Reports*. Vol 10, 5144. 2020.
99. UPPULURI, P. *Et al.* Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol 52. Pgs. 1127-1132. 2008.
100. VITALES, R. *Et al.* In vitro activity of antifungal drugs against *Cladophialophora* species associated with human chromoblastomycosis. *Medical Mycology*. Vol. 47. Pgs. 35-40. 2009.
101. WANG, S. *Et al.* Putative calcium channels CchA and MidA play the important roles in conidiation, hyphal polarity and cell wall components in *Aspergillus nidulans*. *PloS ONE*. Vol 7. 2012.
102. Xiao, S. *Et al.* Deletion of pksA attenuates the melanogenesis, growth and sporulation ability and causes increased sensitivity to stress response and antifungal drugs in the human pathogenic fungus *Fonsecaea monophora*. *Microbiological research*. Edição 244. 2021.
103. YANG, Y. *Et al.* Chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea*: clinicopathology, susceptibility and molecular identification of seven consecutive cases in southern China. *Clinical Microbiology and Infection*. Vol. 19. Pgs. 1023-1028. 2013.
104. YI, X. *et al.* Photodynamic effects on *Fonsecaea monophora* conidia and RAW264.7 in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. V. 176, Pgs. 112-117. Nov. 2017.
105. YOU, Z. *Et al.* Chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea nubica*: first report in northern China and literature review. *Mycopathologia*. Vol. 184. Pgs. 97-105. 2019.
106. YU, J. *Et al.* In vitro interaction of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblastomycosis in China. *Medical mycology*. Vol. 46. Pgs. 745-747. 2008.
107. Yu, S. *Et al.* Calcineurin signaling: lessons from *Candida* species. *FEMS yeast research*. Vol. 15. Pgs. 1-7. 2015.

108. ZHANG, J. *Et al.* Synergistic effect of terbinafine and amphotericin B in killing *Fonsecaea nubica* in vitro and in vivo. *Journal of the São Paulo institute of tropical medicine*. Pgs. 1-7. 2019.
109. ZHANG, J. *Et al.* Tacrolimus interacts with voriconazole to reduce the severity of fungal keratitis by suppressing IFN-related inflammatory responses and concomitant FK506 and voriconazole treatment suppresses fungal keratitis. *Molecular Vision*. Vol. 24. Pgs. 187-200. 2018.
110. ZHANG, J. *Et al.* Tacrolimus, not triamcinolone acetonide, interacts synergistically with itraconazole, terbinafine, bifonazole, and amorolfine against clinical dermatophyte isolates. *Journal de mycologie medicale*. Vol. 28. Pgs. 612-616. 2018.