

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO EXPERIMENTAL DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL ANTIFÚNGICO
CONTRA AGENTES CAUSADORES DA CROMOBLASTOMICOSE**

LEONARDO GIRARDI RANSAN

Porto Alegre, 2024

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

**ESTUDO EXPERIMENTAL DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL ANTIFÚNGICO
CONTRA AGENTES CAUSADORES DA CROMOBLASTOMICOSE**

LEONARDO GIRARDI RANSAN

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Lúcia Scroferneker

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

Porto Alegre, 2024

CIP - Catalogação na Publicação

Girardi Ransan, Leonardo
ESTUDO EXPERIMENTAL DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL
ANTIFÚNGICO CONTRA AGENTES CAUSADORES DA
CROMOBLASTOMICOSE / Leonardo Girardi Ransan. -- 2024.
91 f.
Orientadora: Maria Lúcia Scroferneker.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2024.

1. Microbiologia. 2. Biotecnologia. 3.
Farmacologia. 4. Micologia. 5. Atividade antifúngica.
I. Scroferneker, Maria Lúcia, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

À minha orientadora Maria Lúcia Scroferneker por me receber em seu laboratório, pela orientação ao longo destes anos, por todos os ensinamentos e oportunidades que me proporcionou. Desde o final da minha graduação, antes de ingressar no mestrado, serei eternamente grato pelas oportunidades e confiança que depositou em mim.

Ao Prof. Henri Stephan Schrekker por ter disponibilizado os compostos estudados neste trabalho, por dispor de seu tempo e por estar disponível para discutir ideias.

Ao Prof. Valeriano Corbellini, por ter me ensinado sobre a técnica de Infravermelho e pelo auxílio nos experimentos de FTIR.

À Profa. Jenifer Saffi e Ianka Jacondino Nunes, pelo auxílio nos ensaios de cito e genotoxicidade, por disporem de seu tempo e pela oportunidade de colaboração.

Ao Prof. Régis Zanette, pelo auxílio nos experimentos envolvendo *Drosophila melanogaster* e pela oportunidade de explorar esta área inovadora.

À Daiane Heidrich, por ter me ensinado a teoria e a prática dos testes de atividade antifúngica e por estar sempre disposta a esclarecer dúvidas e a ajudar.

À Mariana Machado Linck pelo auxílio nos experimentos, pela disposição a sempre ajudar, pela iniciativa para sempre aprender mais e pelo companheirismo em todos os momentos no laboratório.

À minha mãe, Vera Girardi, por seu amor incondicional, por me motivar a explorar todas as oportunidades que surgem em minha vida e por ser um modelo de resiliência e determinação.

À minha irmã, Marília Girardi Zorzato, por me apoiar em todos os momentos.

Aos amigos que fiz na graduação, Rodrigo Rossoni, Júlia Sobiesiaki, Sofia Quillfeldt, Matheus Von Spitzenberger e Matheus Souza, e ao meu amigo Daniel Deitos de Moraes, pela parceria, companheirismo e apoio, que levarei para toda a vida.

Ao meu pai, Carlos Leandro Ransan, por seu apoio.

À Maria Eduarda Vieira Azevedo, minha terapeuta, por me ajudar a permanecer são nestes anos do mestrado.

Aos meus colegas do laboratório 325, Paulo Cezar de Moraes e Amanda Carvalho Ribeiro pelos momentos de ajuda e companhia nos momentos de trabalho, nos intervalos dos cafezinhos e momentos de descontração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS por esta grande oportunidade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro que possibilitou este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

Resumo

Introdução: A cromoblastomicose (CBM) é uma infecção fúngica subcutânea causada por espécies de fungos melanizados, geralmente pertencentes ao gênero *Fonsecaea*. Atualmente o tratamento padrão envolve o uso de antifúngicos como o itraconazol (ITZ), mas o tempo de tratamento é longo e as taxas de cura são baixas, devido à natureza recalcitrante desta doença. Sais imidazólicos (SI) são um grupo de compostos químicos de crescente relevância, por apresentarem atividades biológicas diversas. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar seu potencial como fármacos, em termos de atividade antimicrobiana, bem como o risco de apresentarem citotoxicidade e genotoxicidade a células animais. Além disso, a Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) se apresenta como uma promissora técnica para analisar a interação entre antimicrobianos e microrganismos.

Objetivos: Avaliar a atividade antifúngica dos sais imidazólicos (C₁₀)₂MImCl, C₁₆MImCl, C₁₆PyrCl*H₂O, C₁₆M₂ImCl e C₁₆BnMImCl em amostras clínicas de espécies fúngicas causadoras da CBM. Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade destes sais em fibroblastos humanos e de Hamster chinês. Observar se os sais apresentam toxicidade a um modelo de mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*). Além disso, utilizar FTIR para analisar os espectros de interação entre células de *Fonsecaea pedrosoi* e antifúngicos. **Métodos:** Os testes de atividade antifúngica foram executados de acordo com o protocolo M38-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) utilizando 78 amostras clínicas de agentes da CBM. Os testes de citotoxicidade foram realizados utilizando os métodos de vermelho neutro (VN) e metil tiazol tetrazólio (MTT), utilizando fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79) e fibroblastos de pulmão humano (MRC-5), respectivamente. Os testes de genotoxicidade foram feitos usando as células MRC-5 por meio do ensaio cometa alcalino. O teste de toxicidade a animais foi feito utilizando o modelo de mosca-das-frutas. A identificação das alterações metabólicas causadas por antifúngicos comercializados e pelo sal C₁₆PyrCl*H₂O foi realizada utilizando análise de FTIR da biomassa de *F. pedrosoi* e algoritmos de reconhecimento de padrões análise de componentes principais (PCA) e análise por agrupamento hierárquico (HCA). **Resultados:** Os cinco SI tiveram atividade antifúngica contra *F. pedrosoi*, apresentando CIMs e CFMs menores do que as do itraconazol. Todos os SI apresentaram citotoxicidade nos ensaios de vermelho neutro e metil tiazol tetrazólio nas linhagens celulares V79 e MRC-5, respectivamente. Todos os SI apresentaram genotoxicidade à linhagem celular MRC-5 no ensaio cometa. Os sais não apresentaram toxicidade ao modelo de mosca-das-frutas. A FTIR

permitiu analisar e caracterizar os espectros da biomassa de *F. pedrosoi* tratada com antifúngicos e a maior similaridade metabólica foi observada entre o sal C₁₆PyrCl*H₂O (0,125 µg/mL), e os antifúngicos flucitosina (0,5 µg/mL) e caspofungina (0,06 µg/mL). **Conclusões:** Este estudo apresenta os SI como novos antifúngicos promissores contra agentes da CBM, e seu uso pode trazer impactos positivos no manejo clínico de infecções causadas por fungos melanizados. A observação de citotoxicidade e genotoxicidade destes novos sais imidazólicos em células animais evidencia a necessidade de mais estudos para determinar suas potenciais aplicações médicas e biotecnológicas. Adicionalmente, foi proposto um modelo utilizando FTIR que permitiu caracterizar os espectros de alteração metabólica de células de *F. pedrosoi* expostas a antifúngicos.

Palavras-chave: Cromoblastomicose, *Fonsecaea pedrosoi*, atividade antifúngica, sais imidazólicos, citotoxicidade, genotoxicidade, *Drosophila melanogaster*, FTIR.

Abstract

Background: Chromoblastomycosis (CBM) is a subcutaneous fungal infection caused by species of melanized fungi, most commonly belonging to the genus *Fonsecaea*. Currently, the standard treatment involves the use of antifungals such as itraconazole (ITZ), but treatment time is long and cure rates are low due to the recalcitrant nature of this disease. Imidazolium salts (SI) are a group of chemical compounds of increasing relevance, as they present diverse biological activities. However, more studies are needed to evaluate their potential as drugs, in terms of antimicrobial activity, cytotoxicity and genotoxicity to animal cells. Furthermore, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) presents itself as a promising technique for analyzing the interaction between antimicrobials and microorganisms. **Objectives:** To evaluate the antifungal activity of imidazolium salts $(C_{10})_2MImCl$, $C_{16}MImCl$, $C_{16}PyrCl \cdot H_2O$, $C_{16}M_2ImCl$ and $C_{16}BnMImCl$ in clinical samples of CBM-causing fungal species. To evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of these same salts in cell lines of Chinese hamster and human fibroblasts. To observe whether these salts present toxicity to a fruit fly model (*Drosophila melanogaster*). Furthermore, use FTIR to analyze the interaction spectra between *Fonsecaea pedrosoi* cells and antifungals. **Methods:** Antifungal activity tests were performed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocol M38-A2 using 78 clinical samples of CBM agents. Cytotoxicity tests were carried out using the neutral red (VN) and methyl thiazole tetrazolium (MTT) methods, utilizing chinese hamster lung fibroblast cells (V79) and human lung fibroblast cells (MRC-5), respectively. Genotoxicity tests were performed using MRC-5 cells using the alkaline comet assay. The fruit fly toxicity model verification test was carried out by adding the salts to the fly's feed. The identification of metabolic alterations caused by the salt $C_{16}PyrCl \cdot H_2O$ was made utilizing FTIR analysis of the biomass of *F. pedrosoi* and the algorithms principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering analysis (HCA). **Results:** The five SI had antifungal activity against *F. pedrosoi*, presenting MICs and CFMs lower than itraconazole. All SI showed cytotoxicity on both the V79 and MRC-5 cell lines. All SI showed genotoxicity to the MRC-5 cell line in the comet assay. The salts did not present toxicity to the fruit fly model. FTIR enabled the analysis and characterization of the spectra of *F. pedrosoi* biomass treated with antifungals, and the smallest spectral differences were observed between the salt $C_{16}PyrCl \cdot H_2O$, (0,125 $\mu g/mL$), and the antifungals flucytosine (0,5 $\mu g/mL$) and caspofungin (0,06 $\mu g/mL$). **Conclusions:** This study presents SI as promising new antifungals against CBM agents, and their use can have positive

impacts on the clinical management of infections caused by melanized fungi. The observation of the cytotoxicity and genotoxicity of these new imidazolium salts in animal cells highlights the need for further studies to determine their potential medical and biotechnological applications. Additionally, a model using FTIR was proposed that allowed for the analysis of the spectra of metabolic alterations of *F. pedrosoi* cells exposed to antifungals.

Key words: Chromoblastomycosis, *Fonsecaea pedrosoi*, antifungal activity, imidazolium salts, cytotoxicity, genotoxicity, *Drosophila melanogaster*, FTIR.

Lista de figuras

Figura 1. Distribuição dos casos de Cromoblastomicose no mundo.....	23
Figura 2. Conversão do MTT em formazan em reação mediada por reductases NADH-dependentes.....	31
Figura 3. Coleção de espécies utilizadas neste trabalho.....	40
Figura 4. Estruturas moleculares dos SI estudados neste trabalho.....	41
Figura 5. Testes de toxicidade em <i>Drosophila melanogaster</i>	45
Figura 6. Análise por FTIR.....	47
Figura 7. Placas dos testes de determinação das CIMs.....	50
Figura 8. Placas dos testes de determinação das CFMs.....	51
Figura 9. Resultados dos testes de citotoxicidade pelo vermelho neutro.....	53
Figura 10. Resultados dos testes de citotoxicidade pelo MTT.....	54
Figura 11. Resultados do ensaio de genotoxicidade.....	55
Figura 12. Gráficos de sobrevivência de <i>Drosophila melanogaster</i>	56
Figura 13. Espectros obtidos nos tratamentos.....	58
Figura 14. Análise de reconhecimento de padrões em espectros ATR.....	61
Figura 15. Diferenças espectrais entre os tratamentos.....	63

Lista de tabelas

Tabela 1. Estratégia de busca de estudos publicados nas bases de dados PubMed, SciELO e LILACS até outubro de 2023.....	18
Tabela 2. Interpretação de bandas frequentemente encontradas em espectros no infravermelho microbiano	33
Tabela 3. Resultados dos testes de atividade antifúngica.....	49
Tabela 4. Resultados do teste de citotoxicidade por vermelho neutro.....	52
Tabela 5. Resultados do teste de citotoxicidade por MTT.....	53

Lista de abreviaturas e siglas

AMB	Anfotericina-B
ASD	Ágar Sabourad Dextrose
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBM	Cromoblastomicose
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPF	Caspofungina
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil-Sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
FBS	Soro Fetal Bovino
FCZ	Fluconazol
FHM	Feo-hifomicose
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
HCA	Análise Hierárquica de Grupos
ICBS/UFRGS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do RioGrande do Sul
IC ₅₀	Concentração que Apresenta 50% de Inibição Celular
ID	Índice de Dano
ISHAM	Sociedade Internacional de Micologia Humana e Animal
ISA	Isavuconazol
ITS	Espaçador Interno Transcrito
ITZ	Itraconazol
IV	Infravermelho
HCA	Análise Hierárquica de Agrupamentos
CTZ	Cetoconazol
MALDI-TOF	Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight

MTT	Metil Tiazol Tetrazólio
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCA	Análise de Componentes Principais
PCZ	Posaconazol
PLS	Partial Least Squares (regressão por mínimos quadrados parciais)
rDNA	DNA ribossômico
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RS	Rio Grande do Sul, Brasil
SI	Sais Imidazólicos
TBF	Terbinafina
TEF-1 α	Fator de Elongamento da Tradução 1 α
UATR	Reflectância Total Atenuada Universal
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VCZ	Voriconazol
5-FC	Flucitosina

SUMÁRIO

Contents

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Cromoblastomicose: definição	19
2.2 Aspectos históricos	20
2.3 Epidemiologia	22
2.4 Manifestações clínicas	24
2.5 Diagnóstico	25
2.6 Tratamento	26
2.7 Susceptibilidade antifúngica <i>in vitro</i>	28
2.8 Compostos imidazólicos	29
2.9 Ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade	30
2.10 Teste de toxicidade em modelo de mosca-das-frutas	32
2.11 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	33
3 MARCO CONCEITUAL	36
4 JUSTIFICATIVA	37
5 OBJETIVOS	39
5.1 Objetivo geral	39
5.2 Objetivos específicos	39
6 MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
6.1 Testes de atividade antifúngica	Erro! Indicador não definido.
6.2 Testes de citotoxicidade	Erro! Indicador não definido.
6.3 Testes de genotoxicidade	Erro! Indicador não definido.
6.4 Testes de toxicidade em modelo de mosca-das-frutas	Erro! Indicador não definido.
6.5 Análises por FTIR	Erro! Indicador não definido.
7 RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
7.1 Testes de atividade antifúngica	Erro! Indicador não definido.
7.2 Testes de citotoxicidade	Erro! Indicador não definido.
7.3 Testes de genotoxicidade	Erro! Indicador não definido.
7.4 Testes de toxicidade em <i>Drosophila melanogaster</i>	Erro! Indicador não definido.
7.5 Análise da interação fungo-fármaco por FTIR	Erro! Indicador não definido.
8 DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
9 REFERÊNCIAS	Erro! Indicador não definido.
10 CONSIDERAÇÕES FINAIS	Erro! Indicador não definido.

11 PERSPECTIVAS.....	40
ANEXO 1: SUBMISSÃO DE ARTIGO.....	41
ANEXO 2: GUIDELINE RELATIVA AO DESENHO DO ESTUDO	42

1 INTRODUÇÃO

A Cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea crônica causada por fungos melanizados (dematiáceos) pertencentes principalmente à família *Herpotrichiellaceae*. Ela ocorre em regiões tropicais e subtropicais e é a segunda micose de implantação mais prevalente no mundo¹. A CBM é considerada uma doença negligenciada, ou seja, é endêmica em populações de baixa renda nos países em desenvolvimento da América Latina, África e Ásia. O principal foco da CBM no mundo é Madagascar, local onde foi registrado o maior número de casos. Entretanto, muitos casos também já foram reportados na Índia, Austrália, Venezuela, Brasil e outros países da América Latina. No Brasil, a principal área endêmica da CBM é a região amazônica, com diversos registros também nas regiões sudeste e sul¹⁻³.

São conhecidos sete gêneros de fungos que causam a CBM: *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Exophiala*, *Rhinocladiella*, *Veronaea* e *Cyphellophora*. As espécies mais prevalentes como agentes etiológicos da CBM são *F. pedrosoi*, *F. monophora*, e *C. carrionii*. Outras, como *R. aquaspersa*, *P. verrucosa*, *E. dermatitidis*, além de outras espécies do gênero *Fonsecaea* também podem causar esta micose, entretanto são mais raras. Em regiões tropicais e subtropicais, o agente etiológico mais comum da CBM é *F. pedrosoi*, enquanto que em regiões mais secas predomina *C. carrionii*¹.

O tratamento padrão consiste na administração de antifúngicos orais, dos quais o mais utilizado é o itraconazol (ITZ). Entretanto, a taxa de cura varia de 15 a 80% dos casos^{1,4,5}. Como os outros triazólicos, o ITZ inibe a biossíntese do ergosterol da membrana celular via inibição da enzima esterol 14- α -desmetilase⁶. Porém, é sujeito a recidivas, podendo, em alguns casos, ocorrer a instalação de formas crônicas da doença, resistentes à terapia⁷. A terbinafina (TBF) é o medicamento de segunda escolha, com taxas de cura similares às do ITZ^{3,8,9}.

A resistência a antifúngicos apresenta uma crescente ameaça à saúde pública, podendo levar à redução da eficácia dos tratamentos e, conseqüentemente, à diminuição das taxas de cura, além de aumentar a ocorrência de formas crônicas das patologias causadas por agentes fúngicos⁹. A resistência aos antifúngicos é um dos fatores de virulência mais preocupantes dos agentes etiológicos da CBM.

Portanto, é de grande importância o desenvolvimento de novos compostos com atividade antifúngica contra os agentes causadores da CBM. Neste contexto, os sais imidazólicos (SI) têm se mostrado uma alternativa promissora, pois apresentam interações com

sistemas biológicos em geral, apresentando potencial como agentes de inibição contra diferentes espécies de fungos patogênicos, tais como *Candida* spp, *Aspergillus* spp e espécies de dermatófitos¹⁰. No entanto, o conhecimento sobre as atividades biológicas dos SI ainda é limitado, especialmente em termos de atividade antifúngica.

Adicionalmente, quaisquer novos antifúngicos que venham a ser desenvolvidos deverão ser testados para avaliar se estes apresentam toxicidade a células humanas saudáveis, por meio de testes de citotoxicidade e genotoxicidade¹¹⁻¹³. Além disso, é essencial verificar se tais compostos apresentam toxicidade a animais antes de serem testados em seres humanos. Para tal, ensaios de toxicidade tradicionais em modelos murinos podem ser utilizados, mas a utilização de outros organismos modelo, como a mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*) permite tornar a execução destes ensaios mais barata, rápida e prática^{14,15}.

Também se faz necessário desvendar o mecanismo de ação destes novos antifúngicos. Para tal, a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é promissora, pois é uma técnica analítica que requer menor quantidade de reagentes, ser mais rápida e por ter menor custo de operação quando comparada a outras técnicas^{7,16-18}, como o MALDI-TOF.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão da literatura está focada no conhecimento acerca da CBM, sendo que a pesquisa foi direcionada com o intuito de compor os subtítulos **Cromoblastomicose: definição, aspectos históricos, epidemiologia, manifestações clínicas e diagnóstico e tratamento**. Pesquisas adicionais foram realizadas para os subtítulos **compostos imidazólicos, teste de toxicidade em *Drosophila melanogaster* e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier**. A estratégia de busca envolveu as bases de dados PubMed, SciELO e LILACS, incluindo publicações até outubro de 2023. Foram realizadas buscas através dos termos inseridos na Tabela 1, que apresenta o esquema de busca utilizado, número de artigos encontrados em cada base de dados e o número final de artigos incluídos para cada tópico de pesquisa.

TABELA 1. Estratégia de busca de estudos publicados nas bases de dados PubMed, SciELO e LILACS até outubro de 2023.

PALAVRAS-CHAVE/ BASES DE DADOS	PUBMED	SciELO	LILACS	ARTIGOS INCLUÍDOS
Chromoblastomycosis AND antifungal activity	30	1	0	11
<i>Fonsecaea</i> AND antifungal susceptibility	23	0	0	15
Chromoblastomycosis diagnosis	109	0	1	12
Chromoblastomycosis epidemiology	125	1	0	14
Chromoblastomycosis treatment	147	1	0	16
Chromoblastomycosis AND Antifungal activity	28	0	1	12
Imidazolium compounds as new antifungals	19	0	0	16

Imidazolium compounds AND cytotoxicity	108	1	0	12
Imidazolium compounds AND genotoxicity	10	0	0	7
Drosophila melanogaster AND toxicology testing	102	0	0	11
Chromoblastomycosis AND Fourier Transform-Infrared Spectroscopy	6	0	0	6
Fungi identification AND Fourier Transform-Infrared Spectroscopy	10	0	0	10
Microbe-chemical stressor interaction AND Fourier Transform-Infrared Spectroscopy	4	0	0	4
TOTAL				146

2.1 Cromoblastomicose: definição

A CBM é uma micose subcutânea causada por múltiplas espécies de fungos melanizados, também conhecidos como fungos negros^{3,19}. É uma doença caracterizada pela inoculação traumática de esporos fúngicos por implantação de uma fonte ambiental, frequentemente relacionado a atividades agrícolas e/ou extrativistas, que forma uma lesão cutânea no local da inoculação^{1,2}. Esta micose tende a progredir com a disseminação das células fúngicas nos tecidos cutâneos e subcutâneos adjacentes à lesão inicial, e nos casos avançados da doença observa-se resposta granulomatosa fibrosa, crescimento irregular do tecido infectado, presença de micro abscessos, resposta do linfócito auxiliar T do Tipo 2 e a presença de células escleróticas, também chamadas de muriformes, no tecido afetado²⁰⁻²².

A CBM é uma infecção fúngica das denominadas “micoses de implantação”, e são classificadas como “micoses subcutâneas”, que são um conjunto diverso de micoses que têm em comum o modo de infecção, o qual ocorre através de traumatismos transcutâneos^{23,24}, e a única destas a ser considerada uma “doença tropical negligenciada” pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na última década foi a eumicetoma, englobada nas infecções chamadas micetoma²⁵. Entretanto, a prevalência da CBM é equivalente ou superior à do micetoma. Devido à sua distribuição global, maior incidência em populações pobres e ao fato de não ser feita notificação compulsória desta doença, a CBM pode ser considerada uma verdadeira doença negligenciada¹.

Seus agentes etiológicos são um grupo de fungos melanizados pertencentes a uma única ordem do reino fúngico, os *Chaetothyriales*, dentro da família *Herpotrichiellaceae*, pertencentes aos gêneros *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Exophiala* e *Rhinocladiella*⁷. Os gêneros *Veronaea* e *Cyphellophora* foram os mais recentemente descritos, com o estabelecimento das espécies *V. botryosa*²⁶ e *C. ludovingensis*²⁷. *Fonsecaea* spp. são os agentes etiológicos mais frequentemente observados desta doença, predominando em climas tropicais húmidos²⁸.

2.2 Aspectos históricos

Os primeiros casos de CBM dos quais há registro, foram relatados como micetomas, em Madagascar, por Bruas e Fontoynt nos anos de 1903 e 1909, respectivamente²⁹. Neste mesmo período, em 1904, Hoffman observou casos de “chapa”, ou placa, o nome popular para uma doença similar à CBM em Cuba³⁰. Em 1914, seis pacientes brasileiros com lesões nos membros inferiores, conhecidas popularmente na época como “figueiras”, tiveram seus casos publicados em revista alemã por Maximilliano Willibaldo Rudolph³¹. A pesquisa científica desta doença começou em 1911, na cidade de São Paulo, Brasil, quando Pedroso e Gomes observaram casos de dermatite verrucosa em quatro pacientes brasileiros³². Após excluírem a possibilidade de que fosse hanseníase, eles fizeram biópsias de pele nas quais observaram a presença de células esféricas acastanhadas, correspondentes às células muriformes do fungo causador, que são as células características para diagnóstico da CBM. A doença foi inicialmente considerada associada à blastomicose e, conseqüentemente, os autores denominaram a doença de

blastomicose negra. O cultivo das lesões cutâneas dos pacientes rendeu colônias fúngicas escuras, que posteriormente foram classificadas como *Phialophora verrucosa*³³. Devido à Primeira Guerra Mundial, os casos descritos por Pedroso e Gomes foram publicados apenas no ano de 1920¹.

Em 1915, Lane e Medlar, em publicações separadas, reportaram o primeiro caso norte-americano de CBM, observado em um paciente italiano morando na cidade de Boston. O paciente apresentava uma lesão em forma de placa similar à tuberculose verrucosa e após realizar uma biópsia de pele Lane observou a presença de células muriformes. Lane então descreveu a doença como "uma nova blastomicose", enquanto que Medlar identificou o fungo como *Phialophora verrucosa*³⁴. Depois de estudar os isolados dos casos brasileiros relatados por Pedroso e Gomes, em 1922, Emile Brumpt, na França, chegou à conclusão de que estes eram incompatíveis com *P. verrucosa*, ao invés disso pertencendo a uma nova espécie, denominada *Hormodendrum pedrosoi*. Em 1936, Pablo Negroni, na Argentina, criou o gênero *Fonsecaea* e instituiu a espécie *F. pedrosoi*¹.

O nome "cromoblastomicose" foi utilizado pela primeira vez no ano de 1922 por Terra et al. para diferenciar uma doença fúngica cutânea observada no Brasil da confusa síndrome clínica conhecida como "dermatite verrucosa"³⁵. Como o novo nome "cromoblastomicose" sugeria que os agentes etiológicos da doença apresentavam formas de brotamento de levedura nos tecidos, Moore e Almeida propuseram uma nova denominação, "cromomicose", em substituição a "cromoblastomicose"³⁶. O nome cromomicose foi usado por décadas como um guarda-chuva para englobar um grupo heterogêneo de doenças causadas por muitas espécies de fungos melanizados. Este problema foi corrigido em 1974 por Ajello et al., ao criarem o termo "feo-hifomicose", para identificar todas as infecções clínicas e patologicamente distintas da CBM³⁷, ou seja, as que apresentam hifas ao invés de células muriformes quando observadas em biópsias. Há vários nomes populares e científicos usados para se referir à CBM. Porém, de acordo com a Sociedade Internacional de Micologia Humana e Animal (ISHAM), a denominação CBM é a considerada mais aceita¹.

2.3 Epidemiologia

A CBM é a doença causada por fungos melanizados de maior incidência no mundo e é fortemente associada às atividades agrícolas, apresentando maior incidência em homens na idade entre 30 e 60 anos que trabalham na agricultura e/ou atividades extrativistas e é considerada uma doença ocupacional³⁸. A infecção ocorre por meio de traumas transcutâneos, geralmente por objetos ou matéria vegetal contaminados com esporos dos fungos causadores da CBM³⁹. Porém, cada espécie possui potencial infeccioso distinto e a variação deste entre as espécies ainda é pouco compreendida¹. Fungos causadores da CBM já foram isolados a partir de plantas em vários estados brasileiros, como na madeira e espinhos de plantas nativas às áreas endêmicas, como a “dorme-dorme” (*Mimosa pudica*)⁴⁰ e o “babaçu” (*Orbignya phalerata*)⁴¹. A CBM afeta majoritariamente os seres humanos, já que os relatos desta doença em animais, selvagens ou domesticados, são raros, sendo considerados Feo-hifomicose (FHM) devido à ausência de células muriformes nas biópsias destes animais⁴²⁻⁴⁴.

A maioria dos agentes causadores da CBM pertence aos gêneros *Fonsecaea* e *Cladophialophora*, com as espécies *F. pedrosoi* e *C. carrionii* sendo predominantes em áreas tropicais/subtropicais úmidas e em semi-áridas, respectivamente, ao redor do mundo^{1,39}. As infecções atribuídas ao gênero *Rhinocladiella* são menos frequentes e casos associados às espécies dos gêneros *Phialophora* e *Exophiala* são raros. A prevalência da CBM não pode ser determinada com precisão. Estima-se que a incidência de casos da CBM varia de 1: 6.800 em Madagascar a 1: 8.625.000 nos Estados Unidos⁴. A maioria dos casos é registrada na América do Sul, Caribe, África e Ásia, os países Madagascar, Brasil, México, China e Venezuela apresentando as maiores incidências (Figura 1)¹.

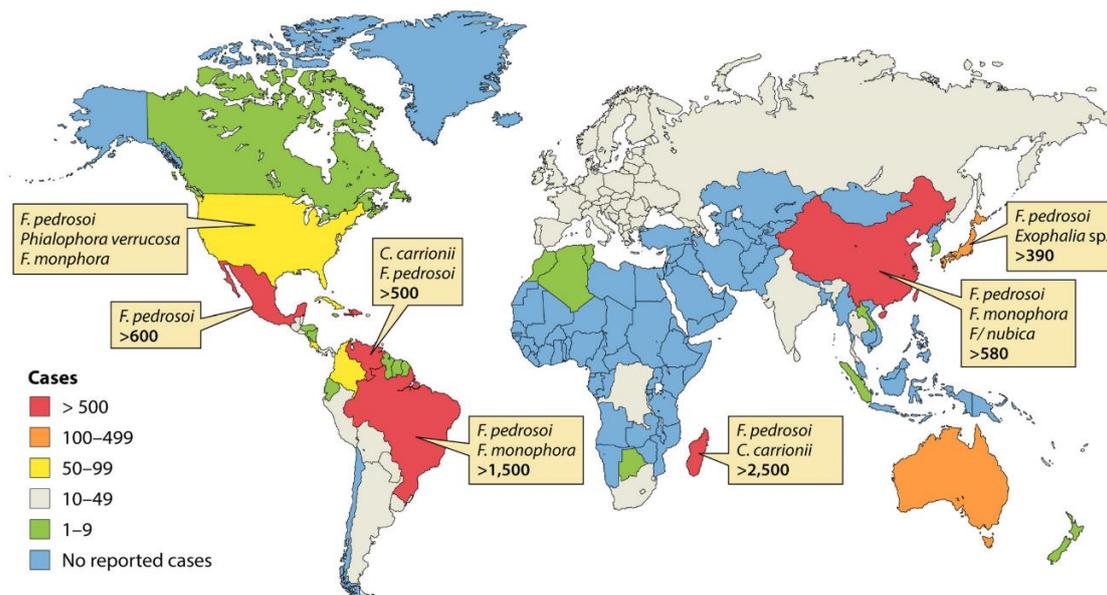


Figura 1. Distribuição de casos de Cromoblastomicose no mundo. Queiroz-Telles, 2017¹.

A CBM é endêmica em muitas áreas geográficas distribuídas por todo o Brasil, principalmente na região norte, onde 872 casos foram relatados retrospectivamente durante as últimas décadas^{38,45-47}. Embora 332 casos tenham sido notificados em outros estados, foi observada uma diminuição significativa no número de novos casos de CBM nos últimos anos, especialmente na região do sul do país^{2,48}. Supõe-se que esta redução se deva a mudanças nas práticas agrícolas, principalmente à crescente mecanização do trabalho no campo, o que reduz a exposição ocupacional aos agentes etiológicos da CBM⁴⁹. As incidências médias anuais de casos de CBM notificados no Brasil foram de 6,4/ano (71 casos/11 anos) no estado do Paraná, 5,9/ano (325 casos/55 anos) no Pará, 4,3/ano (13 casos/3 anos) no Maranhão e 2,6/ano (73 casos/28 anos) para o Rio Grande do Sul^{2,4,23,45,48}. O principal agente etiológico da CBM no Brasil é *F. pedrosoi*, seguido por *F. monophora*, *P. verrucosa* e *E. spinifera*.

Flôres et al. (2001) realizaram um levantamento epidemiológico da CBM no estado do Rio Grande do Sul dos anos de 1963 a 2001. Cem pacientes foram analisados e foi relatada predominância de pacientes masculinos (80% dos casos foram registrados no sexo masculino) e de agricultores de raça branca, com lesões nos membros inferiores e cujas idades variaram de 50 a 59 anos. A maioria dos casos eram da região norte do estado. O tempo médio entre o aparecimento da doença e o diagnóstico médico foi de 14 anos. A forma verrucosa foi a lesão

mais frequentemente relatada (53%). Ferimentos causados por espinhos estiveram associados ao início da doença em 16% dos casos⁵⁰.

2.4 Manifestações clínicas

A CBM acomete regiões expostas do corpo, membros inferiores, mãos e antebraços são os sítios de infecção mais comuns^{3,51,52}. Porém, lesões em outras partes do corpo, como tronco, face, ombros e nádegas também foram relatadas^{5,23,53}. O período entre a inoculação e o surgimento da lesão inicial é incerto e pode variar de semanas a meses; alguns pacientes relatam não se recordarem de nenhuma inoculação¹.

A lesão primária geralmente começa com manifestação na forma de um ferimento cutâneo macular eritematoso e posteriormente evoluir para uma lesão de aspecto papular com coloração rosada e textura lisa. Com o tempo, podem manifestar-se como uma lesão papuloescamosa e progredir com aspectos polimórficos, podendo ser confundida com diversas outras doenças, tanto infecciosas quanto não infecciosas^{39,51,54}. A lesão inicial tende a se espalhar localmente e produzir lesões satélites, quase sempre restritas aos tecidos cutâneo e subcutâneo⁵⁵. A disseminação para órgãos mais profundos é extremamente rara e o prurido é a principal manifestação clínica⁵⁶. Nesta fase inicial, a maioria dos pacientes não procura ajuda médica; e conseqüentemente é raramente observada pelo médico e, se não for diagnosticada, as lesões iniciais podem progredir, assumindo vários tipos de manifestações clínicas com diferentes graus de severidade⁵⁷. Acredita-se que a disseminação ocorra lentamente por propagação contínua das células fúngicas, formando lesões satélites, enquanto que lesões não contíguas ou em locais afastados do sítio inicial podem resultar de autoinoculação por meio de prurido. A disseminação por via linfática para locais distantes no corpo de pacientes foi descrita^{58,59}. Se não for realizado tratamento, seja por terapia com antifúngicos ou por remoção cirúrgica, as lesões iniciais disseminam-se, ao longo de meses ou anos, para outras partes do corpo e evoluem adquirindo aspecto escamoso, áspero ou tumoral (em forma de couve-flor)^{23,54}.

Várias espécies de *Herpotrichiellaceae* estão relacionadas à etiologia da CBM, mas nenhuma ligação com um tipo específico de lesão ou graus leves a graves desta doença foi associada a qualquer agente etiológico específico^{1,5}. Ao contrário de outras micoses de implantação, como a esporotricose e o micetoma, a CBM limita-se aos tecidos subcutâneos e

não afeta fáscia, tendões, músculos e locais osteoarticulares^{3,23}. Entretanto, a CBM progride lentamente e por contiguidade produz alterações fibróticas e estase linfática, levando ao linfedema, que em alguns casos se assemelha à elefantíase. Hiperqueratose, hiperplasia pseudoepiteliomatosa da epiderme, reações piogranulomatosas e acantose irregular alternando com áreas de atrofia são as características histológicas mais importantes da CBM. Em casos mais avançados ocorre transformação maligna do tecido nas lesões mais antigas, geralmente levando à formação de carcinoma de célula escamosa. Infecções bacterianas secundárias são outra complicação frequentemente observada na CBM^{3,5,60}.

De forma similar à hanseníase, a leishmaniose e outras doenças parasitárias, a CBM representa um dos polos (micoses subcutâneas) de um amplo espectro de doenças causadas por espécies distintas de fungos melanizados o outro polo (infecções fúngicas sistêmicas) sendo representado pela FHM⁶¹. Ambas as doenças apresentam lesões do tipo placas e nodulares, e alguns agentes etiológicos podem causar estes dois tipos de micoses. Ambas as infecções acometem tanto hospedeiros imunocompetentes quanto imunossuprimidos, mas a CBM é prevalente em pacientes imunocompetentes^{58,59}.

2.5 Diagnóstico

Devido ao fato das lesões da CBM serem crônicas, polimórficas, recalcitrantes e apresentarem aspecto similar a muitas outras doenças, o diagnóstico é difícil e frequentemente ambíguo^{38,39}. É importante diferenciar a CBM de outras micoses, especialmente em pacientes que apresentam lesões cutâneas e/ou subcutâneas prolongadas.

O diagnóstico da CBM requer confirmação por exame laboratorial micológico direto, cultural e/ou histopatologia. A observação de células muriformes em biopsias das lesões é pré-requisito para o diagnóstico da CBM. Raspados de pele contendo crostas e fragmentos de tecido são lavados com solução de hidróxido de potássio (KOH) de 10 a 40% para permitir a visualização das células fúngicas. Células muriformes únicas ou agrupadas aparecem no microscópio como células redondas a poliédricas (semelhantes a moedas de cobre) com diâmetro de 5 a 12 µm, tipicamente de pigmentação escura, paredes quitinosas espessas com septos transversais e longitudinais¹. A propagação delas se dá por septação e não por brotamento, diferentemente das leveduras⁶². Acredita-se que a célula muriforme seja um

mecanismo de adaptação evolutiva da célula fúngica para permitir sua sobrevivência dentro do hospedeiro. Sua presença está associada a uma intensa resposta granulomatosa, bem como à evasão da resposta imune do hospedeiro⁶¹.

A cultura de células muriformes obtidas por biópsia é realizada em meios de cultura padrão, como o Ágar Sabourad Dextrose (ASD), com ou sem adição de antibióticos como o cloranfenicol, e crescem colônias de pigmentação escura, textura lisa e de crescimento lento. As colônias iniciais apresentam cor verde oliva, tornando-se aveludadas e escurecendo com o tempo, devido à produção de conídios. Diferentemente das leveduras negras, os agentes da CBM não possuem uma fase inicial leveduriforme. A análise por microscopia da cultura permite a identificação em nível de gênero pela observação da morfologia dos corpos de frutificação e dos conídios característicos de cada gênero. O tempo de incubação é de até 6 semanas^{1,7,23}. A identificação da espécie requer sequenciamento molecular, para o qual o gene rDNA ITS barcoding é recomendado. Além disso, estudos taxonômicos podem aplicar outros genes, como os que codificam a β -tubulina e o TEF-1 α , entre outros⁶³⁻⁶⁵.

2.6 Tratamento

O itraconazol (ITZ) é o antifúngico padrão para o tratamento da CBM, devido a sua efetividade contra as espécies causadoras da CBM, por possuir formulação oral e ter menor custo comparado a outros antifúngicos. O mecanismo de ação do ITZ consiste na inibição da biossíntese do ergosterol pela enzima esteroil 14- α -desmetilase⁶. A perda de ergosterol gera membranas celulares defeituosas que perdem fluidez e permeabilidade. Outra vantagem é que diferentemente de outros azóis, como o cetoconazol (CTZ), o ITZ não afeta a esteroidogênese humana, incluindo a resposta adrenal à testosterona e à corticotrofina durante períodos prolongados de terapia contínua⁶⁶. Utilizam-se doses de 200 a 400 mg/dia, a maioria dos casos apresenta melhora dentro de dez meses⁶⁷. Porém, é sujeito a recidivas, em alguns casos podendo haver a instalação de formas crônicas da doença^{9,68}. A taxa de cura do ITZ varia de 15 a 80% dos casos de CBM^{3,52,60,67}. Tamaña variação se deve a vários fatores: diferenças na suscetibilidade a antifúngicos de cada espécie, diagnóstico tardio da doença e do tipo de lesão que o paciente apresenta.

A TBF é o segundo agente antifúngico mais utilizado para o tratamento da CBM, com taxas de cura semelhantes às do ITZ^{8,69,70}. É um derivado da alilamina com efeitos fungistáticos e fungicidas através da inibição da esqualeno-epoxidase, interferindo na biossíntese do ergosterol e na função da membrana fúngica. Ao contrário dos triazóis, que são metabolizados pela via do citocromo P450 3A4, o TBF é metabolizado pela via do citocromo P450 2D6. Assim, as interações medicamentosas da TBF são mínimas, sendo uma vantagem significativa em comparação ao ITZ¹. As doses recomendadas variam de 250 a 500 mg/dia; a duração do tratamento varia dependendo da severidade do caso, até que a resolução das lesões cutâneas seja obtida⁶¹. Outros antifúngicos da classe dos triazóis, como o posaconazol e o voriconazol também mostraram efetividade contra agentes da CBM. Por outro lado, a anfotericina-B não se mostrou eficaz no tratamento da CBM, geralmente apresentando MICs elevados e/ou com grande variação, mas Deng et al.(2018) demonstrou em ensaios in vitro que a anfotericina-B em combinação com TBF teve atividade contra agentes da CBM, particularmente contra as espécies *F. monophora* e *E. spinifera*⁷¹.

A associação de terapias é uma estratégia promissora que vem sendo intensamente estudada para o tratamento dos pacientes de CBM. Consistindo na combinação de algum tipo de tratamento por método físico, como crioterapia utilizando nitrogênio líquido^{72,73}, terapia térmica^{70,74}, remoção de lesões com laser de CO₂⁷⁵ ou terapia fotodinâmica⁷⁶, em conjunto com terapia antifúngica, a associação de terapias traz muitas vantagens ao paciente. Um dos principais benefícios desta estratégia é a redução do período de tratamento, particularmente para os pacientes sob terapia com antifúngicos, por diminuir o tempo de uso destes medicamentos e conseqüentemente reduzindo o risco de efeitos colaterais e custos de tratamento. O estudo da combinação de terapias em conjunto com outros antifúngicos é recomendada, somente ITZ e TBF foram avaliados nesta abordagem até o momento^{72,77,78}.

Dentre os métodos físicos disponíveis, a remoção cirúrgica do tecido infectado é a abordagem que apresenta maior eficácia no tratamento da CBM e é indicada para todos os pacientes com lesões cutâneas pequenas, bem delimitadas e pouco numerosas. A cirurgia também pode ser empregada em conjunto com outros métodos físicos, bem como com a terapia utilizando antifúngicos, como ITZ ou TBF¹.

A terapia ideal para a CBM, assim como para outras infecções causadas por fungos melanizados permanece sob debate. Remoção cirúrgica, terapia com antifúngicos ou combinações de medicamentos têm sido utilizadas, mas muitos casos requerem tratamento

prolongado devido à elevada frequência de recaídas. Conseqüentemente, novas abordagens para o tratamento da CBM são necessárias.

2.7 Susceptibilidade antifúngica *in vitro*

Existem duas classificações para os testes de susceptibilidade, os qualitativos e os quantitativos. Os qualitativos, geralmente, referem-se ao método Kirby-Bauer no qual pequenos discos de um antifúngico são colocados em uma placa de ágar com um inóculo uniforme do microrganismo, resultando ou não em um halo de inibição no crescimento do fungo. Assim, a interpretação está relacionada com a dimensão do halo, sendo seu tamanho diretamente proporcional à sensibilidade do fungo, possibilitando definir se o mesmo é resistente ou sensível ao fármaco. Porém, esse método não permite determinar os valores de CIM e nem de CFM, além de ser mais restrito a testes com leveduras⁷⁹.

Os testes de sensibilidade quantitativos, conhecidos como métodos de diluição, podem ser realizados por meio de macrodiluição ou microdiluição. Ao contrário dos testes qualitativos, os quantitativos possibilitam quantificar e determinar o valor de CIM, o qual é expresso em micrograma por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) e refere-se à concentração mais baixa do antifúngico que inibe totalmente o crescimento do microrganismo⁸⁰. A principal diferença entre os métodos de macro e microdiluição estão relacionadas à preparação. O método de macrodiluição envolve a preparação dos tubos de ensaio que contêm volumes de um mililitro de diferentes concentrações de antifúngicos. Por outro lado, na microdiluição utiliza-se uma placa com noventa e seis poços com concentrações variadas dos fármacos a serem testados, por meio de diluição seriada, sendo o método de referência por ter elevado nível de reprodutibilidade⁷⁹.

A determinação da suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos é útil para avaliar a resistência microbiana intrínseca, mas não permitem prever a resposta clínica do paciente. Isto é particularmente relevante no caso de infecções causadas por fungos dimórficos, uma vez que suas suscetibilidades aos antifúngicos geralmente diferem entre as formas filamentosa e leveduriforme⁸¹. Isto é relevante para o estudo dos agentes CBM, porque uma questão importante é o uso de hifas e conídios em vez de células muriformes como inóculo para testes de atividade antifúngica. As células muriformes, também conhecidas como corpos escleróticos, fumagóides ou células de Medlar, são a forma infecciosa observada em biópsias e acredita-se que sejam altamente resistentes e possam responder de forma diferente quando expostas a

antifúngicos⁸². O cultivo de células muriformes é extremamente difícil, pois uma vez fora do hospedeiro elas alternam à forma filamentosa na grande maioria dos meios de cultura. Há poucos estudos com a produção de células muriformes *in vitro*⁸³⁻⁸⁵.

Apesar das limitações descritas acima, numerosos trabalhos sugerem que as espécies de *Fonsecaea* são altamente suscetíveis *in vitro* a vários compostos triazólicos, incluindo ITZ, VCZ, PCZ e ISA, mas não ao FCZ, 5-FC e AMB^{68,86,87}. Existem alguns trabalhos abordando supostas diferenças na suscetibilidade antifúngica entre espécies do mesmo gênero. Najafzadeh et al. (2010) testaram a susceptibilidade de *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica*, e todos apresentaram valores baixos de CIM para ITZ, VCZ, PCZ e ISA. Valores de CIM mais elevados foram relatados para todas as espécies contra AMB, anidulafungina, caspofungina e FCZ, enquanto valores de CIM para VCZ e ISA mostraram diluições de 1 a 2 vezes maiores para *F. pedrosoi* do que para *F. nubica* e *F. monophora*. PCZ apresentou atividade antifúngica *in vitro* significativa contra todas as espécies testadas, indicando que este azol de espectro expandido tem potencial para o tratamento da CBM. Já as equinocandinas são a classe de antifúngicos menos efetivos contra os agentes da CBM, devido a seus altos valores de CIM e CFM em testes *in vitro*, à falta de formulações orais e ao elevado custo destes fármacos⁹.

2.8 Compostos imidazólicos

Os compostos imidazólicos e seus sais constituem um campo emergente e vasto para o desenvolvimento de novos fármacos. Estes compostos são estruturas moleculares que consistem em um cátion e um ânion que se dissociam em solução e suas propriedades químicas podem ser modificadas pela alteração dos íons e um amplo número de combinações é possível. O cátion pode incluir: imidazólio (IM), metilimidazólio (MIM), heterocíclicos nitrogenados como piridínio (Py), pirrolidínio (Pyr), piperidínio (Pip), amônio quaternário (QAmm) e fosfônio quaternário (QPhosp), ou mesmo uma combinação de muitos destes. Quanto ao ânion, pode ser: um halogênio (Br, Cl), tetrafluoroborato (BF₄), hexafluorofosfato (PF₆), acessulfame (ACS), metanossulfonato (MeS), entre outros⁸⁸. O anel imidazol polar, que contém dois nitrogênios separados por um metileno, forma ligações de hidrogênio através do hidrogênio amino como doador e do nitrogênio imino comoceptor⁸⁹. Além disso, a modificação química

do grupo funcional imidazol permite a desejada reticulação covalente ou física e a produção de outros tipos de compostos, tais como polímeros contendo imidazólio e líquidos iônicos¹⁰.

Em 2004 Lee et al. investigaram as propriedades antimicrobianas e antifúngicas de vários SI no crescimento de bactérias gram-negativas, bactérias gram-positivas e fungos. Por exemplo, foi demonstrado que cloretos e brometos de 1-alkil-3-metilimidazólio, cloretos de 1-alkil-2-metil-3-hidroxiethylimidazólio e N-alkil-N-hidroxiethylpirrolidônio apresentam forte atividade biocida⁹⁰. Em outro estudo, Lee et al. (2018) relataram que células de *Candida albicans* expostas por algumas horas ao SI cloreto de 1-n-hexadecil-3-metilimidazólio (C₁₆MImCl) foram menores quando comparadas às células controle não tratadas. A redução no volume celular foi associado ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática e ao vazamento de conteúdo intracelular após exposição aos compostos citados na presença de apigenina⁹¹. Malinowska et al. (2021) desenvolveram sais imidazólicos derivados de esteróides que apresentaram um amplo espectro de atividade contra fungos patogênicos⁹². Foi observado que os valores de CIM destes sais na sua maioria foram muito inferiores do que as concentrações que apresentaram atividade hemolítica e os resultados apresentaram-se muito promissores. Rodrigo et al. (2018) observou que os sais com substituintes propil e butil foram muito mais ativos contra *C. albicans* do que a AMB, um antifúngico de elevada nefrotoxicidade⁹³. Desai et al. (2020), avaliaram a atividade antifúngica de líquidos iônicos contra *Aspergillus niger* e *A. clavatus* em 4 concentrações (1.000, 500, 200 e 100 µg/mL), sendo que os compostos 3-Cl-C₆H₄, 4-Cl-C₆H₄, 4-NO₂-C₆H₄ e 3-OH-C₆H₄ possuem atividade antifúngica contra a cepa fúngica *A. niger*, enquanto que os compostos 3-Cl-C₆H₄, 3f (4-F-C₆H₄), 3g (3-NO₂-C₆H₄) e 3l (-C₅H₄N) possuem atividade contra *A. clavatus*⁹⁴.

2.9 Ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade são amplamente utilizados em estudos de toxicologia *in vitro*. O propósito destes é avaliar se determinados compostos químicos causam perda da viabilidade de células animais e vegetais. O ensaio de Vermelho Neutro (VN) e o ensaio Metil Tiazol Tetrazólio (MTT) estão entre os mais comumente empregados para a detecção de citotoxicidade ou viabilidade celular após exposição a substâncias tóxicas¹¹.

O ensaio vermelho neutro foi desenvolvido por Borenfreund e Puerner em 1984⁹⁵ desde então é usado como um principais testes para medir a viabilidade celular. O teste pode ser usado para avaliar o dano celular, bem como para determinar o número de células viáveis restantes após a exposição ao agente tóxico. O vermelho neutro é um corante fracamente catiônico que entra na célula por difusão não iônica através da membrana celular. As células vivas absorvem o vermelho neutro, que se concentra nos lisossomos das células. Após o tratamento as células viáveis mantém o corante internalizado e são contadas⁹⁵. Não está claro se esta etapa se deve a um mecanismo ativo ou passivo. Tem sido utilizado como indicador de citotoxicidade em culturas de hepatócitos primários e fibroblastos de camundongo⁹⁶.

O ensaio MTT é outro teste de viabilidade celular frequentemente utilizado para determinar a citotoxicidade após exposição a substâncias tóxicas. O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é um sal de tetrazólio solúvel em água, que é convertido em formazan insolúvel pela clivagem do anel de tetrazólio pela enzima succinato desidrogenase dentro da mitocôndria (Figura 2). O produto formazan tem coloração roxa e é impermeável às bicamadas lipídicas celulares e, portanto, acumula-se nas células saudáveis¹¹. O ensaio MTT foi testado quanto à sua validade em várias linhas celulares⁹⁷. Evidências mais recentes sugerem que a redução do MTT também pode ser mediada por NADH ou NADPH dentro das células e fora das mitocôndrias⁹⁸.

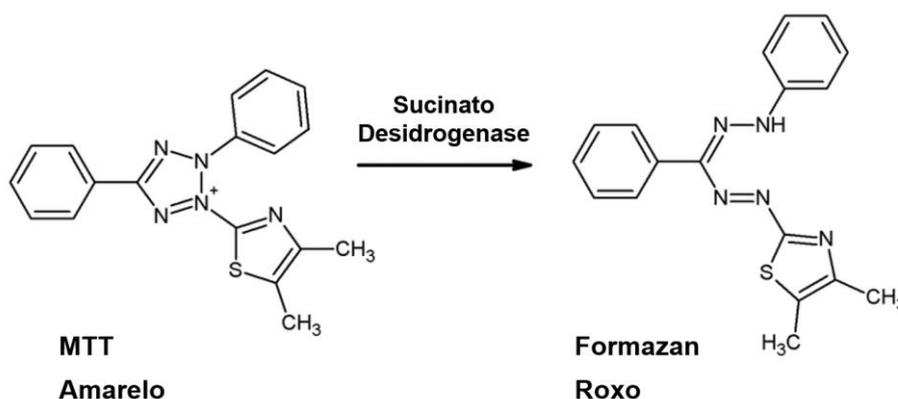


Figura 2. Conversão do MTT em formazan em reação mediada por reductases NADH-dependentes. Badr et al. 2012⁹⁹.

2.10 Teste de toxicidade em modelo de mosca-das-frutas

O uso de modelos alternativos de pequenos organismos em toxicologia cresceu muito na última década. Embora a mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*) tenha sido um modelo importante para biólogos e geneticistas que estudam o desenvolvimento e diferenciação dos tecidos e órgãos em animais, a sua utilidade para estudos toxicológicos só recentemente teve um estabelecimento generalizado. Atualmente, *Drosophila* está sendo usada para estudos mecanísticos de uma série de compostos químicos, incluindo metais pesados^{24,100,101}, etanol¹⁰², pesticidas¹⁰³ e solventes orgânicos¹⁰⁴. *Drosophila* já está sendo utilizada como modelo no estudo de medicamentos para tratamento de câncer de pulmão, cólon e tireóide, tais como oxazol, oxaliplatina, fluvastatina e sorafenib¹⁰⁵. Além disso *Drosophila* se mostra promissora como modelo em testes avaliando as atividades biológicas de compostos derivados de extratos vegetais¹⁰⁶. No entanto, o uso do modelo da mosca na triagem de toxicidade no campo do desenvolvimento de medicamentos ainda está em seus estágios iniciais. A relevância do modelo de *Drosophila* para a compreensão da condição humana sob estresse de substâncias tóxicas se deve à abundância de genes e vias metabólicas conservados que controlam o desenvolvimento, a resposta ao estresse e o metabolismo xenobiótico em espécies de animais^{107,108}.

Existem inúmeras vantagens da mosca-das-frutas para estudos de laboratório, pelo seu curto ciclo de vida (de embrião a adulto em aproximadamente 10 dias a 25°C), a arquitetura genética simples (15.000 genes distribuídos em quatro cromossomos) bem como a facilidade e o baixo custo de manutenção no laboratório em relação a outros modelos animais¹⁰⁹. A caracterização genética e molecular de *Drosophila* vem sendo estudadas há quase um século. Como resultado, a caixa de ferramentas genéticas e moleculares e as bases de dados acerca de sua expressão gênica são tão abrangentes quanto as de qualquer outro modelo experimental. Estas características, juntamente com os recentes desenvolvimentos nas áreas de genômica e metabolômica, tornam o modelo da mosca-das-frutas especialmente relevante e oportuno para o desenvolvimento de novas metodologias de abordagem e movimentos em direção à toxicologia de precisão¹⁴. A mosca-das-frutas é holometabólica, possuindo dois estágios de vida móveis, larval e adulto, e dois estágios sésseis, embrião e pupa, sendo que todos podem ser utilizados para ensaios de toxicidade¹⁵.

2.11 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é um método físico-químico de análise de compostos químicos baseado na interação entre luz e matéria que permite a caracterização dos níveis de energia vibracionais das ligações químicas existentes em uma amostra¹¹⁰. Este método fornece informações sobre o microambiente de moléculas por ser bastante sensível a mudanças na composição de determinado ambiente em nível molecular^{17,18,111}. Isto permite estudar estruturas de sistemas biológicos complexos (tecidos, células e organelas) e suas interações com outros sistemas biológicos ou agentes químicos. A transformação de Fourier é um método matemático que permite identificar as frequências individuais das vibrações atômicas para gerar um espectro no infravermelho (IV), que permite atribuir, de forma qualitativa e quantitativa, os sinais aos principais constituintes macromoleculares das células (ácidos graxos, polissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas, etc)¹¹².

Tabela 2. Interpretação de algumas bandas frequentemente encontradas em espectros no infravermelho de microrganismos obtidas de picos de bandas de segunda derivada.

Frequência (cm ⁻¹)	Interpretação
~3500	O-H: estiramento ou grupo hidroxila
~3200	N-H: estiramento (amida A) de proteína
2959	C-H: estiramento assimétrico de -CH ₃
2934	C-H: estiramento assimétrico de -CH ₃
2921	C-H: estiramento assimétrico de -CH ₂ em ácidos graxos
2898	C-H: estiramento de metina-CH
2872	C-H: estiramento simétrico de -CH ₃
2852	C-H: estiramento assimétrico de -CH ₂ em ácidos graxos
1741	C=O estiramento de ésteres
1715	C=O estiramento de ésteres, RNA/DNA, -COOH
~1695-1675	Amida I: folha pregueada antiparalela/ voltas β de proteínas
~1655	Amida I: α hélice de proteínas
~1637	Amida I: folha β pregueada

1548	Amida II
1515	Banda de tirosina
1468	C-H: deformação >CH ₂
~1400	C=O: estiramento simétrico de COO ⁻
1310-1240	Amida III de proteínas
1250-1220	P=O: estiramento assimétrico de >PO ²⁻ de fosfodiésteres
1200-900	C-O-C, C-O: vibrações do anel de carboidratos
1085	P=O: estiramento simétrico de >PO ²⁻
720	C-H rocking de >CH ₂
900-600	Região <i>Fingerprint</i>

Fonte: Naumann et al. 2000¹¹².

As aplicações práticas da FTIR incluem: análise de tecidos biológicos¹¹³, diagnóstico de tumores¹¹⁴, detecção de contaminantes em alimentos^{115,116}, identificação de microrganismos¹¹⁷, análise de alterações celulares em resposta a estresses ambientais^{118,119}, e o estudo de mecanismos moleculares de adaptação a mudanças nas condições externas¹²⁰. Na ciência médica, a FTIR permite monitorar o curso do tratamento, ou a eficácia do medicamento utilizado, regular os regimes de tratamento, bem como analisar fluidos biológicos, determinar a sensibilidade a agentes antimicrobianos e prever prováveis caminhos de evolução do quadro clínico de pacientes. A FTIR possui muitas vantagens quando comparada a outras técnicas para a análise de sistemas biológicos, tais como: o uso de pequena quantidade de amostra para análise (<50 µL), o fato de ser uma técnica não invasiva em termos de coleta de material do paciente e permitir a análise de alterações bioquímicas em nível molecular⁷.

A interpretação dos espectros e atribuições de picos são etapas fundamentais na análise FTIR de qualquer amostra biológica¹²¹. A FTIR permite de forma rápida, precisa, reprodutível e econômica determinar as alterações moleculares nas membranas, paredes celulares, organelas e tecidos¹²². É uma técnica que possui alta sensibilidade na detecção de pequenas alterações tanto qualitativas quanto quantitativas no perfil dos grupos funcionais de moléculas e fornece informações sobre propriedades como fluidez da membrana, composição lipídica, conteúdo de lipídios saturados ou insaturados, proteínas, RNA, DNA, glicogênio e conformação de ácidos nucleicos¹²³.

O uso de ferramentas quimiométricas na análise de dados, juntamente com avanços recentes na tecnologia computacional que simplificam cálculos matemáticos complexos, leva

ao desenvolvimento da análise multivariada de dados como uma ferramenta poderosa na avaliação da composição bioquímica. A análise de componentes principais (PCA) é usada para redução de dados para identificar um pequeno número de fatores em um número maior de variáveis, permitindo uma avaliação primária da similaridade entre categorias e é muito útil para inspeção visual de matrizes de dados complexas¹²⁴. A Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) é um método utilizado para dividir um conjunto de amostras em grupos menores, de propriedades similares, evidenciando não apenas as semelhanças, mas também as diferenças entre as diferentes amostras. Para a formação desses grupos, cada amostra é primeiramente considerada como um grupo e as distâncias (geralmente a Euclidiana) entre os grupos são calculadas. A HCA baseia-se no princípio de que amostras mais similares estarão próximas espacialmente e podem ser consideradas pertencentes à mesma classe ou grupo¹²⁵.

Apesar de a FTIR já ter muitas aplicações na área da química (controle de qualidade, proveniência de produtos e presença de toxinas) suas aplicações nas áreas biológicas ainda são pouco exploradas. Até o presente momento estudos utilizando FTIR para analisar a interação de microrganismos com agentes químicos, em particular antimicrobianos, são escassos. A FTIR permitiu observar que o uso de recipientes moleculares poliméricos e adjuvantes como mecanismo de entrega de rifampicina causa maior acúmulo deste antibiótico em células de *E. coli*, através da inibição de bombas de efluxo e do aumento da permeabilidade da membrana celular. Neste mesmo estudo, com auxílio da microscopia confocal, a FTIR também apresentou potencial aplicabilidade para o diagnóstico de infecções latentes localizadas em macrófagos, como pneumonia, tuberculose e micoplasma¹²⁶. Em particular, nenhum estudo prévio utilizou a FTIR para analisar as alterações metabólicas causadas por antifúngicos em células fúngicas.

Já foi demonstrado que a FTIR é útil para a identificação de microrganismos. Em 2009 Corbelini et al. utilizaram a FTIR para identificar fungos causadores da CBM por meio da análise da atividade lipolítica das amostras¹²⁷. Posteriormente, em 2021 Heidrich et al. utilizaram a FTIR para identificação de agentes da CBM. Neste estudo foi proposto um modelo com validação cruzada, em conjunto com validação externa, para identificar agentes causadores da CBM com um alto coeficiente de determinação e baixo erro, demonstrando que a FTIR é uma alternativa rápida e barata à biologia molecular para identificação de microrganismos⁷.

3 MARCO CONCEITUAL



4 JUSTIFICATIVA

Este trabalho se justifica pelo fato de que a CBM é uma doença de difícil tratamento, devido à resistência aos antifúngicos disponíveis. Quando não tratada, o paciente pode perder a mobilidade e funcionalidade dos membros, o que leva à dificuldade ou até incapacidade de trabalhar, gerando perdas económicas já que esta doença tem elevada incidência em populações rurais. Pela sua prevalência, tanto a nível global quanto regional, pelo seu impacto na persistência da pobreza e pela sua resistência a antifúngicos, a utilização de novos antifúngicos para avaliar a atividade e eficácia tem sido alvo de muitos estudos na CBM.

A CBM ainda constitui um desafio terapêutico, sendo que o tratamento consiste na remoção cirúrgica das menores lesões, e na terapia com itraconazol ou terbinafina nos casos em que a cirurgia não é factível. Porém, nenhum tratamento até o presente momento apresentou resultados consistentes o suficiente para ser considerado como efetivo. Diversos esquemas terapêuticos foram testados ao longo das décadas. Entretanto, devido ao alto custo dos fármacos, condições socioeconômicas precárias e à natureza recalcitrante da CBM, muitos pacientes não aderem ao tratamento.

Portanto, é necessário o desenvolvimento de novos antifúngicos capazes de combater os agentes etiológicos da CBM, particularmente as espécies do gênero *Fonsecaea*, que são os causadores mais comuns desta doença. Neste contexto um grupo de compostos químicos, o dos sais imidazólicos (SI) se mostra especialmente promissor já que estes apresentam uma ampla gama de atividades biológicas e biotecnológicas, dentre elas a atividade antimicrobiana. Assim, a hipótese deste trabalho baseou-se no fato de que os SI são moléculas promissoras a serem utilizadas como antifúngicos contra os fungos causadores da CBM.

Quando novos antifúngicos são sintetizados estes deverão ser testados para avaliar se estes apresentam efeitos nocivos a células humanas saudáveis, por meio de testes de cito e genotoxicidade. Além disso, é essencial verificar se tais compostos apresentam toxicidade a animais antes de serem testados em seres humanos. Ensaios de toxicidade tradicionais em modelos murinos podem ser utilizados, mas novas alternativas, como a utilização da mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*) se mostram mais baratos, rápidos e práticos.

Também se faz necessário estudar o mecanismo de ação destes novos antifúngicos. A técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é promissora

para esta finalidade, por requerir menor quantidade de reagentes, ser mais rápida e por ter menor custo de operação quando comparada a outras técnicas, como o MALDI-TOF.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades biológicas dos compostos, dando ênfase ao potencial antifúngico contra amostras clínicas de agentes causadores da CBM e comparando-os ao Itraconazol.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar as CIMs dos compostos testados contra amostras clínicas de agentes causadores da CBM por meio de testes de susceptibilidade a antifúngicos;
- Comparar as CIMs dos compostos com as CIMs do Itraconazol;
- Determinar a natureza do potencial antifúngico dos compostos, isto é, se os mesmos apresentam atividade fungistática ou fungicida;
- Verificar a citotoxicidade destes sais imidazólicos por meio do teste de vermelho neutro em células de fibroblastos de hamster chinês;
- Verificar a citotoxicidade destes sais imidazólicos por meio do teste de metil tiazol tetrazólio em células de fibroblastos de pulmão humano;
- Verificar, através do ensaio COMETA alcalino, se os compostos imidazólicos apresentam genotoxicidade a células de fibroblastos de pulmão humano;
- Realizar testes de toxicidade em um modelo de mosca das frutas (*Drosophila melanogaster*);
- Analisar a interação antifúngico-fungo por meio da Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, comparando o efeito de um dos compostos imidazólicos com os de antifúngicos padrões.

11 PERSPECTIVAS

Em relação ao presente trabalho, considerando que alguns dados de metodologias podem ser (re)utilizados em projetos futuros, destacam-se as seguintes perspectivas:

1. Verificar se os SI estudados neste trabalho, por apresentarem atividade antifúngica contra fungos melanizados causadores da CBM, bem como contra espécies de *Candida*, SI também são eficazes contra outros grupos de fungos patogênicos, como *Sporothrix* spp e *Aspergillus* spp;

2. Utilizar o protocolo de análise biomassa fúngica para caracterizar os espectros de outras espécies de fungos de relevância médica expostos a antifúngicos;

3. Observamos que o dano ao DNA observado nas células MRC-5 após a exposição aos SI pode ter sido resultado da indução de ROS levando a oxidação das bases nitrogenadas, quebras de fita simples e quebras de fita dupla. Para verificar se de fato este é o mecanismo de toxicidade dos SI testados uma opção seria realizar um pré-tratamento das células com N-acetilcisteína antes de realizar o ensaio cometa.

Esse trabalho contribuiu na implementação de uma nova linha de pesquisa no laboratório, por meio da utilização de FTIR para avaliação das alterações bioquímicas da biomassa de fungos expostos a antifúngicos, e também oportunizou parcerias importantes com outros grupos de pesquisa, visando o compartilhamento de conhecimento, ferramentas e de estrutura laboratorial para projetos futuros.

ANEXO 1: SUBMISSÃO DE ARTIGO

O artigo intitulado “**Determination of antifungal activity and cytotoxicity of new imidazolium salts against agents of chromoblastomycosis**” será submetido à revista “**Mycoses**”. O artigo ainda não foi enviado, pois o grupo de pesquisa com o qual foi feita colaboração para execução dos ensaios de genotoxicidade recomendou a realização de ensaios adicionais para verificar a consistência dos dados obtidos neste experimento.

ANEXO 2: GUIDELINE RELATIVA AO DESENHO DO ESTUDO

Tópico	Item	Checklist	Reportado na página
Título e resumo			
	1a	Identificação como um estudo in vitro no título	1
	1b	Sumário estruturado do projeto, métodos, resultados e conclusões	13
Introdução			
	2a	Embasamento científico e explicação de racional	15
	2b	Objetivos específicos e hipóteses	38
Métodos			
Intervenção	3	A intervenção em cada grupo, incluindo como e quando foi administrado, com detalhes suficientes para permitir replicabilidade	39
Resultados	4	Medidas primárias e secundárias de resultados completamente definidas e pré-especificadas, incluindo como e quando foram avaliadas	47-65
Tamanho amostral	5	Como o tamanho amostral foi determinado	39-46
Randomização: geração de sequências	6	Método usado para gerar a sequência de alocação aleatória	NA
Mecanismo de ocultação de alocação	7	Mecanismo usado para implementar a sequência de alocação aleatória (por exemplo, recipientes numerados sequencialmente), descrevendo quaisquer medidas tomadas para ocultar a sequência até que a intervenção fosse atribuída	NA

Implementação	8	Quem gerou a sequência de alocação aleatória, quem inscreveu os dentes e quem designou os dentes para intervenção	NA
Cegamento	9	Se feito, quem ficou cego após a designação para a intervenção (por exemplo, prestadores de cuidados, aqueles que avaliam os resultados)	NA
Análise estatística	10	Métodos estatísticos usados para comparar grupos	47,52,55,58
Resultados			
Números analisados	11a	Para cada grupo, o número de itens incluído em cada análise e se a análise foi ordenada de acordo com os grupos	47-58
Resultados e estimação	11b	Para cada desfecho primário e secundário, resultados para cada grupo e o tamanho estimado do efeito e sua precisão	47-58
Discussão			
Limitações	12a	Limitações dos testes, reconhecer potenciais fontes de viés, de imprecisão e, se relevante, a multiplicidade das análises	69,71
Generalização	12b	Generalização (validação externa, aplicabilidade) das descobertas do estudo	66,68,69,71
Interpretação	12c	Interpretação consistente com os resultados, considerando vantagens e desvantagens, e outras evidências relevantes	66-72
Outras informações			
Protocolo	13	Onde os protocolos completos podem ser encontrados	39-46
Financiamento	14	Fontes de financiamento e suporte	4

Guideline CRIS (Checklist for Reporting In Vitro Studies) para estudos in vitro das informações deste trabalho. Baseado na guideline CONSORT adaptada por Faggion et al. (2012)¹⁹⁰ e Krithikadatta et al. (2014)¹⁹¹. NA = Não se Aplica.