

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

**AGENTES DA CROMOBLASTOMICOSE: RELAÇÃO DA MELANINA COMO
FATOR DE PROTEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES USANDO
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE
FOURIER**

DAIANE HEIDRICH

Porto Alegre

2017

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

**AGENTES DA CROMOBLASTOMICOSE: RELAÇÃO DA MELANINA COMO
FATOR DE PROTEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES USANDO
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE
FOURIER**

DAIANE HEIDRICH

Orientadora: Profª. Dra. Maria Lúcia Scroferneker

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

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Heidrich, Daiane

AGENTES DA CROMOBLASTOMICOSE: RELAÇÃO DA MELANINA
COMO FATOR DE PROTEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES
USANDO ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM
TRANSFORMADA DE FOURIER / Daiane Heidrich. -- 2017.
160 f.

Orientador: Maria Lúcia Scroferneker.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Cromoblastomicose. 2. FTIR. 3. DHN melanina.
4. Estresse Oxidativo. 5. Suscetibilidade a
antifúngicos. I. Scroferneker, Maria Lúcia , orient.
II. Título.

Agradecimentos

À minha orientadora Maria Lúcia Scroferneker pelos ensinamentos, pela disponibilidade, na qual pude contar em todos os momentos destes últimos doze anos de convivência. Desde o momento que entrei no laboratório, como aluna da escola técnica de Biotecnologia, passei por toda a graduação de Farmácia como aluna de Iniciação Científica, fiz Mestrado e agora Doutorado, ela acreditou na minha capacidade e confiou sempre no meu trabalho, muito obrigada!

Ao Prof. Valeriano Corbellini, pelos ensinamentos sobre Infravermelho, por ter me acolhido na UNISC, ter confiado em mim e ter tido paciência.

Ao Prof. Régis Adriel Zanette, que sem esperar nada em troca, se colocou à disposição para o que eu precisasse.

À Profa. Patrícia Valente, com quem aprendi muito durante esses anos todos.

Às minhas eternas “chefas”, Cheila Denise Ottonelli Stopiglia e Tatiane Caroline Daboit, que fazem parte dos meus pensamentos cada vez que eu tomo alguma decisão nos experimentos.

Aos meus colegas e amigos, que participaram de forma ativa no trabalho aqui exposto e me ensinaram muito Mauricio Ramírez-Castrillón e Sandra Denise Carvalho Mendes.

Às colegas Danielle Machado Pagani e Carina Alves Timotheo que me ajudaram muito na finalização dos trabalhos.

À minha colega mestranda Lidiane da Silva Bonapaz, pelo auxílio na manutenção do laboratório e pela paciência neste último ano.

À Karine de Oliveira Alves, que foi a única aluna de Iniciação Científica que me acompanhou durante todo o Doutorado.

A todos os alunos de iniciação científica que me auxiliaram nos experimentos em algum momento durante estes quatro anos de estudo, Alessandra Helena da Silva Hellwig, Amanda Carvalho Ribeiro, Caroline Flores, Carolini da Silva, Elissa Kerli Fernandes, Felipe Castro Nepomuceno, Fernanda Fraga Gomes, Letícia Lazzarotto, Paula Thomé Dalbem, Rafaela Pletsh Gazzi, Suelen Vigolo e Zélia Marina Monteiro Andrade.

A todo o pessoal do laboratório 325 do ICBS pela companhia nos intervalos dos cafezinhos e momentos de descontração.

À minha amiga Rita de Cássia Rosa, ótima professora de língua portuguesa, pela amizade e correção desta tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS pela

oportunidade de realizar mais este sonho.

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

Agradeço a Deus pela oportunidade que me deu, a vida.

Aos meus pais, Noelci e Antenor, pelo amor incondicional.

Ao meu irmão Daniel, à minha cunhada Viviane e aos meus sobrinhos Bruno e Júlia, pela presença na minha vida.

Às minhas avós, Adalida Sander e Júlia Heidrich, e aos demais familiares pelo apoio que me deram durante esses quatro anos, em especial, às minhas primas Joseane Adam e Patrícia Heidrich do Amaral, por estarem ao meu lado durante momentos difíceis.

Ao meu tio Eloi Sander, que foi um exemplo de homem e pai. Humildemente, abria sua casa todos que precisassem de um lar, assim me deu muitos primos. Fique em paz.

À Anita Silvano Oliveira Figueira, amiga e colega de toda a graduação, que hoje é uma estrela no céu. Você foi e é um exemplo de não importa a origem ou as dificuldades que encontramos no caminho, se houver dedicação e amor, você chegará ao seu destino.

RESUMO

Introdução: a cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea causada por fungos melanizados de vários gêneros. Alternativas para identificação das espécies causadoras de CBM utilizando Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi avaliada somente para o gênero *Exophiala*. Os testes de suscetibilidade aos antifúngicos não foram realizados para algumas espécies de agentes da CBM, sendo importante essa determinação para auxiliar na escolha adequada do tratamento. Embora o conhecimento de que a melanina tenha ação contra radicais livres oxidantes, poucos estudos exploraram o tema e somente o gênero *Fonsecaea* foi avaliado, utilizando baixo número de isolados.

Objetivo: propor identificação dos agentes da CBM por FTIR e avaliar o perfil das diferentes espécies na resposta aos antifúngicos. Além disso, quantificar a melanina e avaliar a influência da mesma na sobrevivência dos isolados após estresse oxidativo e na suscetibilidade aos antifúngicos.

Métodos: foram utilizados até 78 isolados clínicos em cada experimento. Para FTIR, a aquisição dos espectros de 4000-650 nm foi realizada a partir de técnica proposta; O teste de suscetibilidade a seis antifúngicos e o ensaio de estresse oxidativo frente ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram realizados com os isolados pareados (com e sem inibidor de melanina - triciclazol); A melanina foi extraída pelo método álcali-ácida e quantificada por gravimetria.

Resultados: o modelo proposto de identificação por FTIR teve alto coeficiente de determinação e baixo erro da linha de tendência e validação cruzada obtidas. Terbinafina foi o antifúngico que apresentou menores concentrações inibitórias mínimas (CIMs) contra gêneros *Fonsecaea*, *Phialophora* e duas espécies de *Rhinochrysiella*. Já anfotericina B e itraconazol apresentaram as CIMs mais elevadas. Além disso, outras diferenças entre gêneros e espécies foram observadas; gênero *Rhinochrysiella*, quando a melanina não está inibida, mostrou maior sensibilidade ao estresse causado por H₂O₂ do que *Phialophora* e *Fonsecaea*, enquanto que os dois últimos foram os mais resistentes ao estresse oxidativo. Ao passo de que a quantidade de melanina extraída de *Rhinochrysiella* foi significativamente menor do que *Phialophora* e *Fonsecaea*.

Conclusão: Foi proposto um modelo que apresentou alta capacidade de classificar as 13 espécies de agentes causadores de CBM. A identificação e o teste de suscetibilidade aos antifúngicos nas práticas clínicas são importantes para auxiliar no tratamento. Além

disso, os estudos que avaliaram a relação com melanina, tanto quantificação, estresse oxidativo e relação com antifúngicos comprovam, em agentes da CBM, o fator protetor da melanina frente a agressões externas sofridas por determinados gêneros e espécies, agressões estas relacionadas ao ambiente e ao hospedeiro.

Palavras chaves: FTIR, ITS, estresse oxidativo, quantificação de melanina, DHN melanina, *Rhinocladiella similis*, sensibilidade a antifúngicos.

ABSTRACT

Background: chromoblastomycosis (CBM) is a subcutaneous mycosis caused by melanized fungi of several genera. Alternative for species identification using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) was evaluated only for the genus *Exophiala*. The testing of antifungal susceptibility was not evaluated for some species of CBM agents, and this determination is important to aid in the appropriate choice of treatment. Although the knowledge that melanin has an action against oxidative radicals, few studies have explored the subject and only the genus *Fonsecaea* has been evaluated, using a low number of isolates.

Objective: to propose identification of the CBM agents by FTIR and to evaluate the profile of the different species in the response to antifungals. Furthermore, to quantify the melanin and to evaluate its influence in the survival of the isolates after oxidative stress and the susceptibility to the antifungals.

Methods: up to 78 clinical isolates were used in each experiment. For FTIR, the acquisition of the 4000-650 nm spectra was performed using a proposed technique; The susceptibility test using six antifungal agents and the oxidative stress test using hydrogen peroxide (H₂O₂) were performed with the isolates in paired form (with and without melanin inhibitor - tricyclazole); The melanin was extracted by the alkali-acid method and quantified by gravimetry.

Results: the proposed FTIR identification model had a high coefficient of determination and a low error of the trend line and cross-validation obtained. Terbinafine was the antifungal that presented smaller minimum inhibitory concentrations (MICs) against genera *Fonsecaea*, *Phialophora* and two species of *Rhinocladiella*. While amphotericin B and itraconazole had the highest MICs. In addition, other differences between genera and species were observed; Genus *Rhinocladiella*, when melanin is not inhibited, showed greater sensitivity to stress caused by H₂O₂ than *Phialophora* and *Fonsecaea*, while the last two genera were the most resistant to oxidative stress. Moreover, the amount of melanin extracted from *Rhinocladiella* was significantly lower than *Phialophora* and *Fonsecaea*.

Conclusion: a model that presented high capacity to classify the 13 species of CBM agents was proposed. Identification and testing of antifungal susceptibility in clinical settings are important to aid in treatment. Furthermore, the studies that evaluated the relationship with melanin, both quantification, oxidative stress and relation with

antifungals demonstrate, in CBM agents, the protective factor of melanin against external aggressions of environmental and host suffered by certain genera and species.

Key-words: FTIR, ITS, oxidative stress, melanin quantification, DHN melanin, *Rhinoctadiella similis*, antifungal sensitivity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Esquema de busca de estudos publicados até fevereiro de 2017 nas bases de dados PubMed, SciELO e LILACS.....20
- Figure 2-** Identificação dos gêneros causadores da cromoblastomicose. *Fonsecaea* (A); *Cladophialophora* (B); *Rhinocladiella* (C); *Veronaea* (D); *Exophiala* (E); *Phialophora* (F); *Cyphellophora* em meio ágar de aveia (G); *C. ludovingensis* em ágar Sabourad dextrose, barra: 10µm (H).....23
- Figura 3-** Filogenia de uma seleção representativa de espécies em *Chaetothyriales*, com base em sequências de LSU alinhadas. Construído com Máxima verossimilhança implementada em MEGA 7. Valores de bootstrap > 80% de 100 conjuntos de dados. Caixas coloridas representam complexos de espécies mostrados com ramificações, citadas por de Hoog et al., 2011 [60]; Feng et al., 2014 [61] e Vicente et al., 2013 [62]. Cepas tipos em negrito.....25
- Figura 4-** Distribuição de casos de cromoblastomicose no mundo.27
- Figura 5-** Tipos clínicos de lesões observadas em pacientes com cromoblastomicose. (A) Lesão inicial; (B) Lesões nodulares; (C) Lesão tumoral (tipo couve-flor); (D) Lesão cicatricial; (E) Lesão verrucosa hiperqueratótica; (F) Placa violácea.....29
- Figura 6-** Agentes da cromoblastomicose nos exames micológicos direto e cultural. Células escleróticas observadas por microscopia óptica (400X) no exame micológico direto com KOH 20% (A); Colônia de agente da cromoblastomicose em meio ágar Sabouraud dextrose crescidas em 28 dias à 30°C (B).....29
- Figura 7-** Vias metabólicas para a síntese de melanina a partir de vários precursores e geração de melanina di-hidroxinaftaleno (DHN) (A), eumelanina (B) feomelanina (C) e

neuromelanina (D).....48

Figura 8- Via biossintética da melanina di-hidroxinaftaleno (DHN) e seus metabólitos. Triciclazol (Tr) inibe a redução de 1,3,6,8-THN e 1,3,8-THN para a scitalone e vermelona, respectivamente. Resultando na acumulação de scitalona, flaviolina, 3,3'-biflaviolina e 2-hidroxijuglona (2-HJ).....49

Figura 9- Crescimento de *Fonsecaea pedrosoi* em ágar batata dextrosado com e sem 16 µg/mL de triciclazol (A e B, respectivamente) com 14 dias/30°C.....49

Figura 10- Via da DHN melanina (A), via DOPA melanina (B) e os níveis de transcrição de genes de enzimas envolvidas (azul). Seta de cor vermelha: regulação positiva; Seta de cor verde: regulação negativa; Estrela: expressão do gene significativamente diferente entre amostra albina e melanizada.....51

Figura 11- Espectros para avaliação qualitativa de melaninas. (A) Espectro de ressonância (ESR) de DHN melanina de *Fonsecaea* sp.; (B) Espectro de IV de DHN melanina de *Aspergillus tubingensis*; (C) Espectro de UV-VIS de DHN melanina de *Aspergillus carbonarius* (1) e *Paecilomyces variotii* (2).....53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações efetivas mínimas (CEMs) de antifúngicos contra agentes da cromoblastomicose e metodologias descritas nos 49 estudos encontrados na literatura até janeiro de 2017.....32
- Tabela 2** - Interpretação de algumas bandas frequentemente encontradas em espectros de infravermelho microbiano obtidas de picos de bandas de segunda derivada.....38
- Tabela 3** - Estudos de avaliação de fungos patogênicos humanos a partir de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	<i>Amphotericin B</i> (anfotericina B)
ANN	<i>Artificial Neural Network</i> (Redes Neurais Artificiais)
A/R	<i>Absorbance/Reflectance</i> (Absorbância/Refletância)
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
A/T	<i>Absorbance/Transmission</i> (absorção/transmissão)
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i> (Reflexão Total Atenuada)
BT2	β -tubulina (<i>β-tubulin</i>)
CBM	Cromoblastomicose
CEM	Concentração Efetiva Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopic</i> (Microscópio Confocal de Varredura à Laser)
DHN	di-hidroxinaftaleno
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
DRIFTS	<i>Diffuse Reflectance</i> (Reflexão Difusa)
FIR	<i>Far-infrared</i> (infravermelho distante)
ESR	<i>Electron spin resonance</i> (ressonância de <i>spin</i> eletrônico)
FCZ	<i>Fluconazole</i> (fluconazol)
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>

	(Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier)
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i> (Análise Hierárquica de Agrupamentos)
2-HJ	<i>2-hydroxyjuglone</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
ISHAM	<i>International Society for Human and Animal Mycology</i> (Sociedade Internacional de Micologia Humana e Animal)
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> (Espaçador interno transcrito)
ITZ	<i>Itraconazole</i> (itraconazol)
IV	Infravermelho
KTZ	<i>Ketoconazole</i> (cetoconazol)
L-DOPA	3,4-di-hidroxi-L-fenilalanina
LSU	<i>Large subunit of ribosomal RNA</i> (Subunidade grande do ácido ribonucleico (RNA) ribossomal)
MALDI-ToF MS	<i>Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight</i> (espectrometria de massa)
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software</i> (Programa para análise de evolução molecular gênica)
MIR	<i>Mid-infrared</i> (infravermelho médio)
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i> (Comitê Nacional para Padronização de Laboratório Clínico)
NIR	<i>Near-infrared</i> (infravermelho próximo)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise por Componentes Principais)

PHM	Feohifomicose
PLS	Partial Least Squares (regressão por mínimos quadrados parciais)
PSZ	<i>Posaconazole</i> (posaconazol)
SciELO	<i>Scientific Electronic Library Online</i> (Biblioteca Científica Eletrônica Virtual)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RS	Estado do Rio Grande do Sul, Brasil
TEF-1 α	<i>Translation elongation factor 1-α</i> (Fator de alongamento de tradução 1 α)
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i> (Microscopia eletrônica de transmissão)
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
TRB	<i>Terbinafine</i> (terbinafina)
VRZ	<i>Voriconazole</i> (voriconazol)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Cromoblastomicose: definição.....	19
2.2 Aspectos Históricos.....	21
2.3 Taxonomia.....	22
2.4 Epidemiologia.....	26
2.5 Manifestações Clínicas.....	28
2.6 Diagnóstico.....	28
2.7 Tratamento.....	30
2.8 Ensaio de suscetibilidade aos antifúngicos.....	31
2.8 Identificação de fungos no Infravermelho com Transformada de Fourier.....	37
2.9.1 <i>Identificação de fungos patogênicos humanos por FTIR.....</i>	<i>41</i>
2.10 Melanina.....	46
2.10.1 <i>Biossíntese e inibição de melanina em agentes da cromoblastomicose...47</i>	
2.10.2 <i>Caracterização em agentes da cromoblastomicose: análises qualitativas e quantitativas.....</i>	<i>52</i>
2.10.3 <i>Funções da melanina em agentes da cromoblastomicose.....</i>	<i>54</i>
2.10.3.1 <u>Função estrutural.....</u>	<u>54</u>
2.10.3.2 <u>Função antioxidante:</u>	
<u>proteção ambiental e escape do sistema imunológico.....</u>	<u>54</u>
2.10.4 <i>Melanina: relação com antifúngicos.....</i>	<i>56</i>
3 JUSTIFICATIVA.....	58
4 OBJETIVOS.....	59

4.1 Objetivo primário.....	59
4.2 Objetivos secundários.....	59
5 REFERÊNCIAS.....	60
6 ARTIGO 1	
Rapid classification of chromoblastomycosis agents by Fourier Transform- Infrared Spectroscopy supervised by ITS rDNA region.....	85
7 ARTIGO 2	
Chromoblastomycosis caused by <i>Rhinocladiella similis</i>: case report.....	103
8 ARTIGO 3	
Melanin biosynthesis inhibition increases the susceptibility to antifungals in chromoblastomycosis agents.....	107
9 ARTIGO 4	
Melanin confers protection against oxidative stress in chromoblastomycosis agents.....	128
10 ARTIGO 5	
Quantification of melanin in chromoblastomycosis agents.....	139
11 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	153
12 PERSPECTIVAS.....	156
13 ANEXOS	
<i>13.1 Comprovante de submissão à Revista Mycoses</i>	
Melanin confers protection against oxidative stress in chromoblastomycosis agents.....	157
<i>13.1 Comprovante de submissão à Revista Medical Mycology</i>	
Quantification of melanin in chromoblastomycosis agents.....	159

1 INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea crônica geralmente recidivante à terapia. É prevalente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo o Brasil o segundo país com maior número de casos do mundo, com mais de 1.500 casos. Enquanto que Madagascar apresenta mais de 2.500 casos da doença. A CBM está sendo considerada uma doença “órfã negligenciada”, acometendo à população mais empobrecida, principalmente de zonas rurais, que muitas vezes convivem anos com a doença sem diagnóstico e tratamento [1]. Assim, a doença pode levar a alterações malignas [2-6], infecções bacterianas secundárias e deformidades físicas, causando isolamento social do paciente [7-10].

Até o momento, são conhecidos sete gêneros de fungos melanizados (dematiáceos) que causam a doença [11-13], sendo eles *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Exophiala*, *Rhinocladiella*, *Veronaea* e *Cyphellophora*. Os cinco primeiros gêneros apresentam duas ou mais espécies envolvidas, já os dois últimos gêneros foram descritos como causadores de CBM recentemente, em 2015 e 2016, respectivamente, sendo somente uma espécie de cada um deles relatada, *Veronaea botryosa* [14] e *Cyphellophora ludovingensis* [15].

A identificação da espécie só é possível pela avaliação do sequenciamento de uma região do DNA, geralmente a região espaçadora interna transcrita do ácido desoxirribonucleico (DNA) ribossomal (*Internal Transcribed Spacer* - ITS) [16]. Porém, a identificação de agentes da CBM, à partir da análise de DNA, envolve vários passos metodológicos, requerendo tempo de trabalho e elevados custos. Desta forma, a busca de novas ferramentas para identificar microrganismos, como a Espectroscopia no Infravermelho de Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – FTIR) [17]. Em agentes da CBM, um estudo para o gênero *Exophiala*, avaliou parcialmente os isolados numa tentativa de classificação das espécies do gênero [18]. Porém, nenhum outro gênero da CBM foi avaliado com o intuito de identificação das espécies que compõem os gêneros envolvidos na doença.

Para tratamento desta micose, o medicamento padrão dos antifúngicos orais é o itraconazol (ITZ) e o de segunda escolha é a terbinafina (TRB). Porém, a taxa de cura varia de 15 a 80% em monoterapia com estes fármacos [12,19-25]. Assim, a avaliação dos gêneros e espécies *in vitro* a estes e outros antifúngicos podem auxiliar na melhor

escolha de tratamento. Estudos comparativos entre gêneros e espécies envolvidas na CBM, que tenham sua identificação confirmada por análise molecular, em relação à suscetibilidade a antifúngicos são escassos na literatura [26-30], sendo que entre gêneros, foram observadas algumas diferenças no perfil de suscetibilidade, como *Cladophialophora* spp. que foi mais sensível ao ITZ comparado ao *Phialophora* spp. no estudo de Yu et al. [28]. Já entre as espécies de mesmo gênero, não foram encontradas diferenças, porém, não foram realizados testes estatísticos para confirmação [26,29]. Além disso, há agentes da CBM que não passaram por testes de suscetibilidade após avaliação molecular para confirmação ou identificação em nível de espécie, como *C. bantiana* e *P. americana*, por exemplo.

Uma característica comum aos fungos causadores de CBM é a presença de um polímero derivado do 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN-melanina) nas paredes de células vegetativas e parasitárias [31,32]. Um inibidor específico deste tipo de melanina é o 5-metil-1,2,4-triazol [3,4] benzotiazole (triciclazol), que tem sido utilizado em estudos que avaliaram a melanina de agentes da CBM *in vitro* [33,34].

Estudos têm demonstrado que a melanina em *Fonsecaea* spp. age protegendo o fungo contra fatores ambientais agressivos, como a irradiação UV e pHs extremos [35,36]. A melanina é também considerada um composto imunologicamente ativo e um importante fator de virulência, uma vez que a presença do pigmento pode evitar facilmente a fagocitose [37] e tornar as células mais resistentes à liberação de espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos [38]. Apenas dois estudos foram realizados avaliando a melanina em relação ao estresse oxidativo causado por H₂O₂ diretamente em conídios *in vitro*. Estes estudos utilizaram, exclusivamente, *Fonsecaea* spp. dentre os agentes da CBM e em baixo número de isolados, um de *F. pedrosoi* e quatro *F. monophora* por Cunha et al. [34] e Sun et al. [36], respectivamente.

Embora a estrutura da DHN melanina seja desconhecida, há alguns métodos para a análise qualitativa da mesma, como o espectro de varredura no ultravioleta e visível (UV-VIS) [39], sendo que não foi realizado para comparação entre agentes da CBM. Análise quantitativa de melanina foi realizada, também, para apenas um isolado de *Fonsecaea* sp., sendo quantificada por gravimetria em relação à razão de melanina extraída por massa de fungo [40].

Alguns estudos avaliaram a influência da melanina na resposta *in vitro* aos antifúngicos. As melaninas L-DOPA e DHN de outros fungos mostraram efeito protetor contra alguns antifúngicos [41-43]. Porém, comparando dois isolados melanizados e

dois albinos de *F. monophora*, não houve diferenças significativas em relação à suscetibilidade dessas amostras frente a oito antifúngicos [36]. No entanto, esse resultado pode estar relacionado ao baixo número de isolados testados.

Assim, é observado que nos temas expostos acima, o gênero *Fonsecaea* foi mais explorado. No entanto, poucos estudos e baixos números de isolados foram considerados na avaliação desse gênero. Estudo com maior número de isolados e avaliando os demais gêneros de agentes da CBM pode basear uma melhor discussão sobre os assuntos para, assim, ampliar o conhecimento da doença e possibilitar melhorias no tratamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão da literatura está focada nos aspectos relacionados à CBM, sendo que, para compor os subtítulos **Cromoblastomicose: Definição, Histórico, Taxonomia, Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Tratamento e Diagnóstico**, foram utilizadas revisões dos últimos cinco anos, disponíveis na base de dados PubMed até fevereiro de 2017. Já para os subtítulos **Ensaio de suscetibilidade aos antifúngicos, Identificação de fungos no Infravermelho com Transformada de Fourier e Melanina**, a estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed, SciELO e LILACS, com publicações até fevereiro de 2017. Foram realizadas buscas entre os dias 15 a 28 de fevereiro de 2017 através dos termos inseridos na **Figura 1**, na qual apresenta o esquema de busca utilizado, número de artigos encontrados, inseridos, repetidos e totais parciais e finais de incluídos para cada tema.

2.1 Cromoblastomicose: definição

A CBM é uma micose subcutânea causada por várias espécies de fungos melanizados, também chamados de dematiáceos [11-13]. Essa doença é caracterizada por: inoculação traumática por implantação de uma fonte ambiental, fortemente relacionado a atividades de agricultura, levando a uma lesão cutânea inicial no local da inoculação; envolvimento progressivo e crônico das lesões cutâneas e subcutâneas com resposta granulomatosa fibrosa, microabscessos e, muitas vezes, proliferação de tecidos; resposta do linfócito T auxiliar do tipo 2 (Th2) e envolvimento humoral ineficazes; e presença de células escleróticas, também chamadas de muriformes, no tecido afetado [1].

A CBM está inserida no grupo de “micoses de implantação”, também chamado de “micoses subcutâneas”, que são um grupo de doenças fúngicas heterogêneas em que o modo de infecção compreende vários tipos de traumatismos transcutâneos [44,45]. Outras micoses de implantação são esporotricose, eumicetoma, lobomicose, feohifomicose (PHM) e entomofetomicose, sendo que CBM é uma das mais frequentes. Porém, a única delas considerada “doença tropical negligenciada” pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2013, foi a eumicetoma, que está englobada nas infecções chamadas de micetoma [46,47]. No entanto, a prevalência da CBM é

Bases de dados:	PUBMED			SciELO			LILACS			Rep.	Total incluídos					
	Palavras-chaves											Artigos encontrados	Artigos incluídos			
Chromoblastomycosis																
Filtros: <i>Review</i> e últimos 5 anos (5 years)																
									20	19	19					
Total relacionados à Definição, Histórico, Taxonomia, Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Tratamento e Diagnóstico:											19					
Chromoblastomycosis AND Fourier Transform-Infrared Spectroscopy																
									1	0	0	1	0	0	0	1
Fonsecaea or Cladophialophora or Phialophora AND Fourier Transform-Infrared Spectroscopy																
									1	0	0	1	0	0	-1	0
Exophiala AND Fourier Transform-Infrared Spectroscopy																
									6	0	0	4	0	0	-1	3
Rhinocladiella AND Fourier Transform-Infrared Spectroscopy																
									0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi identification AND Fourier Transform-Infrared Spectroscopy																
									188	0	0	29	0	0	-2	27
Total relacionados à Identificação de fungos por Infravermelho com Transformada de Fourier:											31					
Chromoblastomycosis AND antifungal activity																
									28	0	1	12	0	1	-1	12
Chromoblastomycosis AND antifungal sensitivity																
									29	0	1	17	0	1	-6	12
Chromoblastomycosis AND antifungal susceptibility																
									23	1	0	14	1	0	-13	2
Fonsecaea AND antifungal activity																
									22	0	1	9	0	1	-6	4
Fonsecaea AND antifungal sensitivity																
									31	0	1	18	0	1	-16	3
Fonsecaea AND antifungal susceptibility																
									16	1	0	12	1	0	-13	0
Cladophialophora AND antifungal activity																
									14	0	0	7	0	0	-5	2
Cladophialophora AND antifungal sensitivity																
									19	0	0	9	0	0	-8	1
Cladophialophora AND antifungal susceptibility																
									10	1	0	4	1	0	-5	0
Phialophora AND antifungal activity																
									16	0	0	4	0	0	-4	0
Phialophora AND antifungal sensitivity																
									24	0	0	5	0	0	-3	2
Phialophora AND antifungal susceptibility																
									11	0	0	2	0	0	-2	0
Exophiala AND antifungal activity																
									36	0	0	9	0	0	-6	3
Exophiala AND antifungal sensitivity																
									54	0	0	11	0	0	-5	6
Exophiala AND antifungal susceptibility																
									39	0	0	10	0	0	-9	1
Rhinocladiella AND antifungal activity																
									3	0	0	1	0	0	-1	0
Rhinocladiella AND antifungal sensitivity																
									5	0	0	3	0	0	-2	1
Rhinocladiella AND antifungal susceptibility																
									3	0	0	1	0	0	-1	0
Total relacionados ao Ensaio de suscetibilidade aos antifúngicos:											49					

Continuação

Bases de dados: PUBMED SciELO LILACS

Palavras-chaves	Artigos encontrados			Artigos incluídos			Rep.	Total incluídos
Chromoblastomycosis AND Melanin	21	1	1	12	1	1	-1	13
Fonsecaea AND Melanin	19	2	1	14	2	1	-12	5
Cladophialophora AND Melanin	5	2	2	0	0	0	0	0
Phialophora AND Melanin	8	0	1	2	0	0	0	2
Exophiala AND Melanin	35	3	3	2	1	1	2	2
Rhinocladiella AND Melanin	0	0	0	0	0	0	0	0
Total relacionados à Melanina :								22

Figura 1. Esquema de busca de estudos publicados até fevereiro de 2017 nas bases de dados PubMed, SciELO e LILACS.

equivalente ou superior a do micetoma, apresenta distribuição global e atinge os mais empobrecidos com alta refratariedade. Assim, a CBM pode ser considerada uma verdadeira doença negligenciada, sendo chamada de “doença órfã negligenciada” [1].

2.2 Aspectos Históricos

Possíveis casos de CBM, também conhecida como cromomicose, foram relatados como micetomas, em Madagascar, por Bruas e Fontoynt em 1903 e 1909, respectivamente [48,49]. Em 1914, seis casos de pacientes brasileiros com lesões nos membros inferiores, popularmente conhecidas como "figueiras", foram publicados em revista alemã por Maximilliano Willibaldo Rudolph [50]. O início da pesquisa científica sobre a doença começou em 1911, na cidade de São Paulo, Brasil, quando Pedroso e Gomes [51] observaram casos de dermatite verrucosa em quatro pacientes brasileiros, apresentando células esféricas acastanhadas encontradas em biópsia de pele, correspondendo a células muriformes, que são as células-chaves para diagnóstico de CBM. Por causa da Guerra Mundial, os casos descritos por Pedroso e Gomes foram publicados apenas em 1920 [51]. Em 1915, Lane e Medlar, em publicações separadas, relataram o primeiro caso norte-americano de CBM, que foi observado em um paciente italiano morando em Boston. Lane descreveu a doença como "uma nova blastomicose",

enquanto que Medlar classificou o isolado como *Phialophora verrucosa* [52,53]. Depois de estudar isolados dos casos brasileiros relatados por Pedroso e Gomes, em 1922, Emile Brumpt, na França, concluiu que não eram compatíveis com *P. verrucosa*, mas pertenciam a uma nova espécie, *Hormodendrum pedrosoi* [54]. Em 1936, na Argentina, Pablo Negroni, criou o gênero *Fonsecaea* e foi instituída a espécie *F. pedrosoi* [55].

O nome "cromoblastomicose" foi empregado pela primeira vez em 1922 por Terra et al. [56], porque os agentes etiológicos da doença mostravam-se como levedura nas formas de brotamento no tecido. Em 1935, Moore e Almeida propuseram uma nova denominação, "cromomicose", como uma substituição de "CBM" [57]. Com o tempo, o nome cromomicose foi utilizado para abranger um grupo heterogêneo de doenças micóticas causadas por um amplo espectro de fungos melanizados. Este problema foi corrigido em 1974 por Ajello et al. [58], que criou o termo "feohifomicose", para definir todas as infecções clinicamente e patologicamente distintas da CBM, apresentando hifas no tecido ao invés de células leveduriformes. Há uma variedade de nomes populares e científicos usados para referenciar CBM [1]. Porém, de acordo com a Sociedade Internacional de Micologia Humana e Animal (ISHAM), a denominação CBM é a considerada mais aceita.

2.3 Taxonomia

A maioria dos agentes da CBM, na sua forma de células escleróticas, é membro da ordem *Chaetothyriales* e família *Herpotrichiellaceae* [1]. Até o momento, são sete os gêneros causadores de CBM, sendo *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Exophiala* e *Rhinocladiella* tradicionalmente conhecidos e os gêneros *Veronaea* e *Cyphellophora*, que foram descritos recentemente [14,15], sendo as espécies envolvidas nestes casos a *Veronaea botryosa* e a *Cyphellophora ludovingensis*.

O gênero *Exophiala* compreende as chamadas "leveduras negras", que são capazes de se reproduzir por brotamento. Já os demais agentes da CBM são estritamente filamentosos em cultivo e apresentam crescimento lento. Apresentam melanina nas células reprodutivas e vegetativas e, portanto, as colônias possuem tons oliváceos, cinza escuras ou pretas. A distinção em nível de gênero é feita pela morfologia do seu modo de reprodução assexuada. A **Figura 2** mostra as estruturas, principalmente conidióforos, que identificam os gêneros causadores da CBM. Em *Fonsecaea*, os conídios são

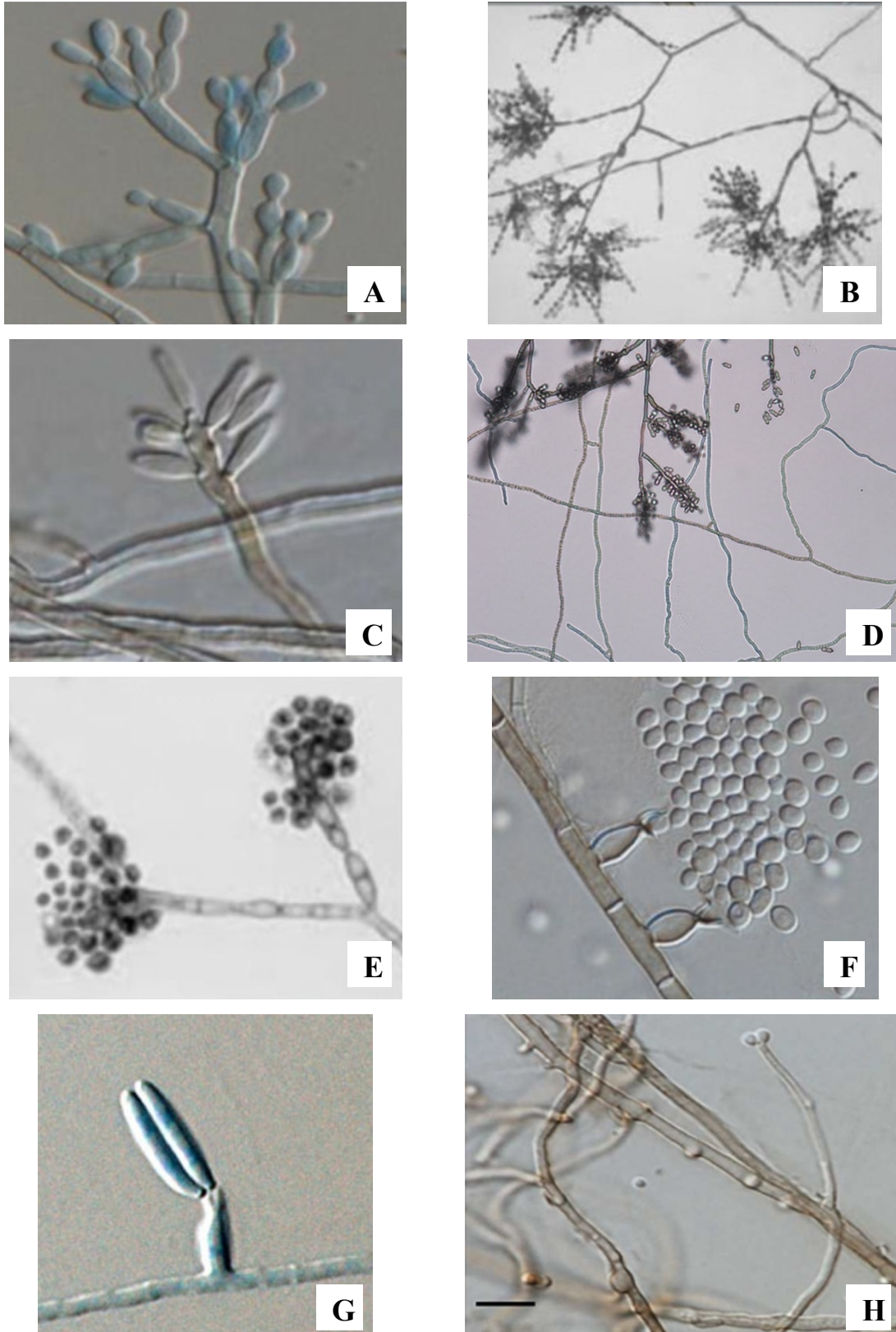


Figure 2. Identificação dos gêneros causadores da cromoblastomicose. *Fonsecaea* (A); *Cladophialophora* (B); *Rhinocladiella* (C); *Veronaea* (D); *Exophiala* (E); *Phialophora* (F); *Cyphellophora* em meio ágar de aveia (G); *C. ludovingensis* em ágar Sabouraud dextrose, barra: 10µm (H).

Fontes: Adaptado de Queiroz-Telles et al. [1]; Zhu et al. [14]; Gomes et al. [15].

agrupados em denticulos e dispostos em cadeias curtas (A), enquanto que no gênero *Cladophialophora*, os conídios são dispostos em cadeias longas e retas (B). Em *Rhinocladiella*, os conídios são produzidos simpodialmente em extensões celulares alongadas, com conídios não septados (C), enquanto que *Veronaea* apresenta conídios septados (D). No gênero *Exophiala*, as células produtoras de conídios são anelídeas e apresentam intensa produção (E). Em *Phialophora* e em *Cyphellophora*, em meios indutores de produção de conídios, como meios a base de batata e aveia, apresentam cabeças viscosas através de colares, com *Cyphellophora* sendo diferenciado da *Phialophora* por conter conídios septados e curvos (F, G) [1]. Em meios não indutores de conídios, como ágar Sabouraud dextrose (ASD), foi observado que em *C. ludovingensis*, novo agente da CBM, há hifas com clamidósporos, extensões laterais e fiálide mal diferenciada com produção de conídios (H) [15].

Para a distinção de espécies, o sequenciamento de genes é necessário, sendo utilizada a região ITS ou outras regiões do DNA [15]. Por outro lado, embora o número de espécies relacionadas à etiologia de CBM tenha aumentado após a taxonomia molecular, nenhuma associação clínica ou terapêutica tem sido atribuída a nova genotipagem de espécies até o momento [1].

O sequenciamento de parte do ácido desoxirribonucleico ribossomal (rDNA), como do gene que codifica a subunidade grande do ácido ribonucleico (RNA) ribossomal (LSU) são utilizadas para avaliação filogenética (**Figura 3**) [15]. As espécies estão dispersas por toda a árvore filogenética, sendo que os agentes da CBM estão representados nos seis *clusters*. O “clado salmoni” contém o agente da CBM *Veronaea botryosa* [14]; no “clado jeanselmei” estão incluídas as espécies de *Rhinocladiella* (*R. aquaspersa*, *R. phaeophora* e *R. tropicalis*) [16,59] e *Exophiala spinifera* [1]; “clado dermatitidis” contém *Exophiala dermatitidis* e *Exophiala xenobiotica* [1]; “clado carrionii” contém *Cladophialophora carrionii* [1], *Phialophora verrucosa* e *Phialophora americana*, e seu teleomorfo *Capronia simiimmersa* [63]; “clado bantiana” apresenta *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea monophora*, *Fonsecaea nubica*, *Fonsecaea pugnacius* [1], *Cladophialophora bantiana* [64] e *Cladophialophora arxii* [65]; e o “clado europaea” apresenta *C. ludoviensis* [15].

As demais espécies apresentadas na árvore filogenética (**Figura 3**) correspondem a espécies relacionadas, mas causadoras de outras micoses, tais como as PHM causadas por *Cladophialophora devriesii* [66], *Cladophialophora boppii* [67], micoses superficiais de pele ou unhas causadas por *Cyphellophora laciniata*,

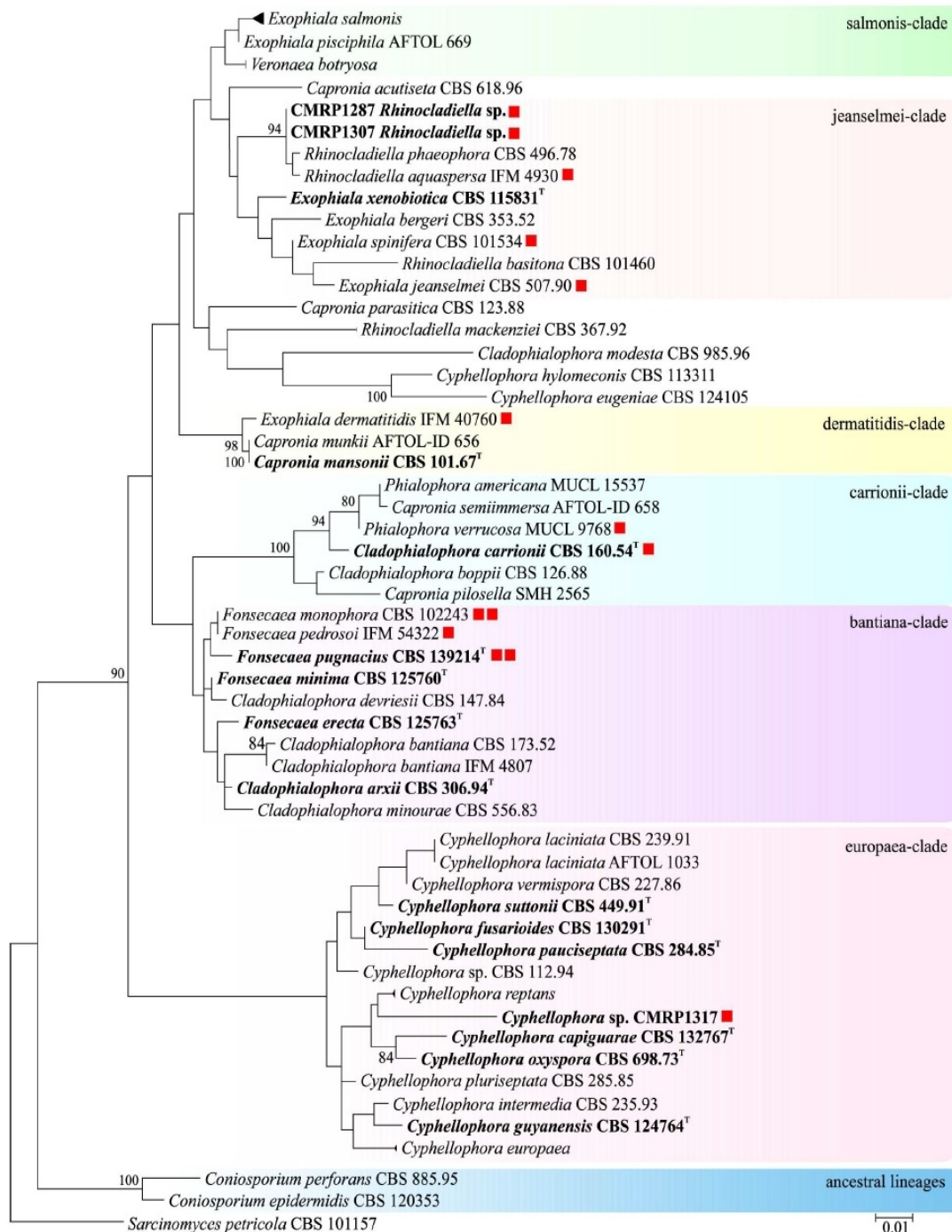


Figura 3. Filogenia de uma seleção representativa de espécies em *Chaetothyriales*, com base em sequências de LSU alinhadas. Construído com máxima verossimilhança implementada em MEGA 7. Valores de bootstrap > 80% de 100 conjuntos de dados. Caixas coloridas representam complexos de espécies mostrados com ramificações, citadas por de Hoog et al., 2011 [60]; Feng et al., 2014 [61] e Vicente et al., 2013 [62]. Cepas tipos em negrito.

Fonte: Gomes et al., 2016 [15].

Cyphellophora pluriseptata, *Cyphellophora pauciseptata* [61]. *Cyphellophora fusarioides* foi isolada de lavado brônquico humano e de *Cyphellophora suttonii*, de lesão subcutânea na orelha de um cão [61]. Outras espécies são isolados ambientais, tais como, *Cyphellophora vermispora*, *Cyphellophora guyanesis* [61], *Fonsecaea minima* [68] e *Fonsecaea erecta* [69].

2.4 Epidemiologia

A prevalência da doença em homens é citada em estudos brasileiros, sendo que na região sul do Brasil, a proporção foi de 4 homens para 1 mulher [7]. Já na região Amazônica, a distribuição da razão de sexo foi maior (17: 1) [70,71]. A menor proporção entre o sexo feminino seria a proteção ao fungo causada pela progesterona [72,73]. Em relação à idade, em estudo na Amazônia, a faixa etária variou de 25 a 85 anos, sendo que 86% dos casos, o paciente tem entre 41 e 70 anos [70,71].

A CBM está fortemente associada às atividades agrícolas, o que reforça a natureza ocupacional da doença [74]. Durante as atividades de trabalho, os indivíduos nas áreas endêmicas são provavelmente infectados por diversos traumas [75-78]. Porém, o potencial invasivo dos agentes difere entre as espécies e ainda é pouco compreendido [1]. Alguns agentes da CBM já foram isolados de plantas em Estados brasileiros, tais como madeira e espinhos de plantas nativas próximas às áreas endêmicas [62,79], como a “dorme-dorme” (*Mimosa pudica*) [80] e o babaçu (*Orbignya phalerata*) [75,81,82]. Infecções por agentes da CBM em anfíbios e mamíferos são escassas, sendo consideradas PHM, pois não há presença de células escleróticas nos tecidos destes animais [83-86].

As espécies mais frequentemente associadas à CBM pertencem aos gêneros *Fonsecaea* e *Cladophialophora*, sendo que as infecções causadas por *F. pedrosoi* e *C. carrionii* são normalmente observadas nas áreas tropicais e subtropicais endêmicas em todo o mundo (**Figura 4**) [1]. As infecções devidas ao gênero *Rhinocladiella* são menos frequentes, enquanto alguns casos foram associados com espécies dos gêneros *Phialophora* e *Exophiala*.

Semelhante a maioria das micoses endêmicas, a CBM não é uma doença de notificação obrigatória e, como consequência, não há uma avaliação precisa das incidências ou prevalência desta micose. Assim, a prevalência é estimada por série de casos CBM, variando de 1: 6.800 em Madagascar a 1: 8.625.000 nos Estados Unidos

[44,74]. A maioria dos casos é da América do Sul, Caribe, África e Ásia, tendo a maior incidência, além de Madagascar, no Brasil, México, China e Venezuela, respectivamente (Figura 4).

No norte da ilha de Madagascar, o clima de floresta tropical propicia o predomínio de *F. pedrosoi*, enquanto que no sul, o clima árido da região causa um predomínio de *C. carrionii*, que é responsável por 41% das infecções por agentes da CBM [48,49,77,87]. No Brasil, a CBM é endêmica na região norte, onde 872 casos foram relatados nas últimas décadas [44,70,71,82]. O principal agente etiológico da CBM no Brasil é *F. pedrosoi* (incluindo outras espécies de mesmo gênero), seguido de relatos esporádicos de *P. verrucosa* e *E. spinifera*. No México, *F. pedrosoi* também é o agente etiológico mais comum da CBM (95,8%) [19,88]. Já no sul da China, *F. monophora* tem sido a mais prevalente das espécies, sendo isolada em 83,3% dos casos de CBM causados pelo gênero *Fonsecaea* [89].

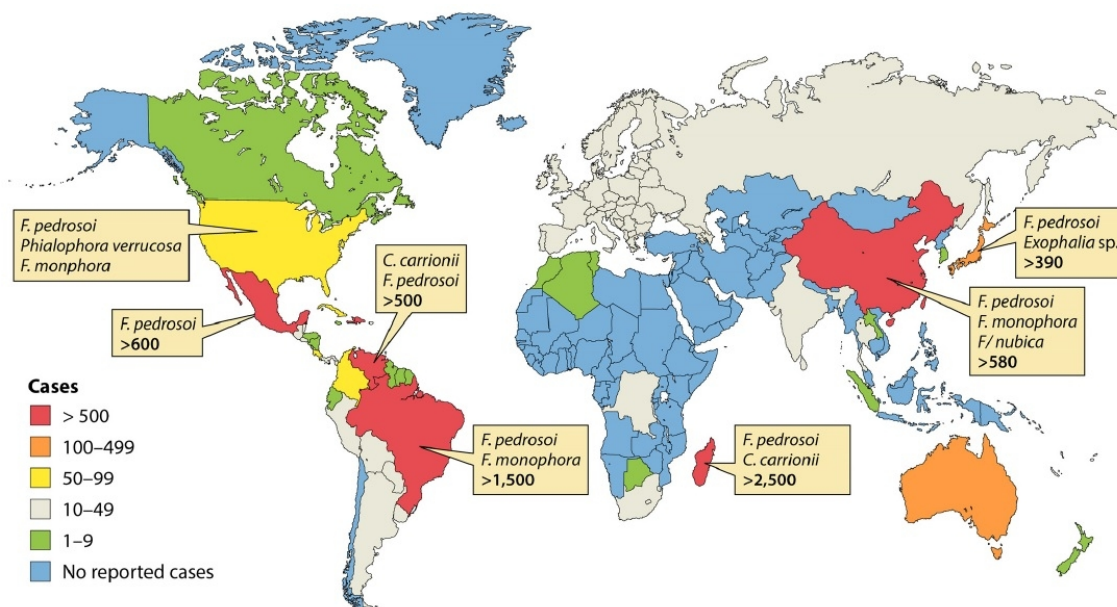


Figura 4. Distribuição de casos de cromoblastomicose no mundo.

Fonte: Queiroz-Telles, 2017 [1].

2.5 Manifestações Clínicas

A inoculação traumática do fungo no tecido cutâneo se dá, geralmente, em áreas não protegidas do corpo, com frequência em pés, joelhos, pernas e mãos [12,19,44,90], podendo levar semanas ou meses para o aparecimento da lesão. A lesão inicial pode começar como uma manifestação cutânea macular eritematosa (**Figura 5A**), que progride a uma lesão papular rosa e lisa e, após, evoluir com aspectos polimórficos, podendo ser confundida com outras doenças. A lesão inicial pode se espalhar localmente ou disseminar-se pelos vasos linfáticos até locais mais distantes [91,92], desenvolvendo mais lesões satélites, com frequente apresentação de prurido e dor. Já lesões não contínuas ou de localização remota, podem ser resultantes da autoinoculação [1]. Se não houver tratamento nessa fase, as lesões iniciais tentam assumir vários tipos de formas clínicas com diferentes graus de gravidade [93-95], os quais não têm sido associados a nenhum agente etiológico específico até o momento. Porém, a disseminação que ultrapasse o tecido cutâneo e subcutâneo é extremamente rara [96,97].

A classificação das formas clínicas é composta de lesões do tipo nodular, tumoral (tipo couve-flor), verrucosa, cicatricial ou placa [44,94,98] (**Figura 5B-F**), podendo apresentar uma combinação de lesões. Tendo em vista o manejo do paciente e prognóstico favorável da doença, as lesões de CBM devem ser classificadas de acordo com a classificação clínica e grau de gravidade [44]. O tempo de evolução da doença, local anatômico e tamanho das lesões, podem levar à alterações malignas [2-6], infecções bacterianas secundárias e deformidades físicas (devido ao linfedema), sendo que a última é responsável pelo isolamento social do paciente [7-10].

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico da CBM é realizado pela observação de células escleróticas no material coletado através do exame micológico direto ou histopatológico. Morfologicamente, 2 a 4 células com paredes espessas e acastanhadas de 5 a 12 µm agregam-se e apresentam septação transversal e longitudinal [12,19,93,99,100] (**Figura 6A**). A sensibilidade de exame micológico direto varia de 90 a 100%. Este método é rápido, fácil, barato e dá suporte à clínica para o início do tratamento [1]. Entretanto, a identificação da cultura é importante porque as espécies de *Fonsecaea* podem ser menos sensíveis aos antifúngicos do que *C. carrionii* [101,102]. Além disso, a identificação pode contribuir para os dados sobre epidemiologia dos agentes etiológicos [103].

Quando cultivadas em meios de cultura de rotina, como ASD com ou sem



Figura 5. Tipos clínicos de lesões observadas em pacientes com cromoblastomicose. (A) Lesão inicial; (B) Lesões nodulares; (C) Lesão tumoral (tipo couve-flor); (D) Lesão cicatricial; (E) Lesão verrucosa hiperqueratótica; (F) Placa violácea.

Fonte: Queiroz-Telles et al., 2017 [1]

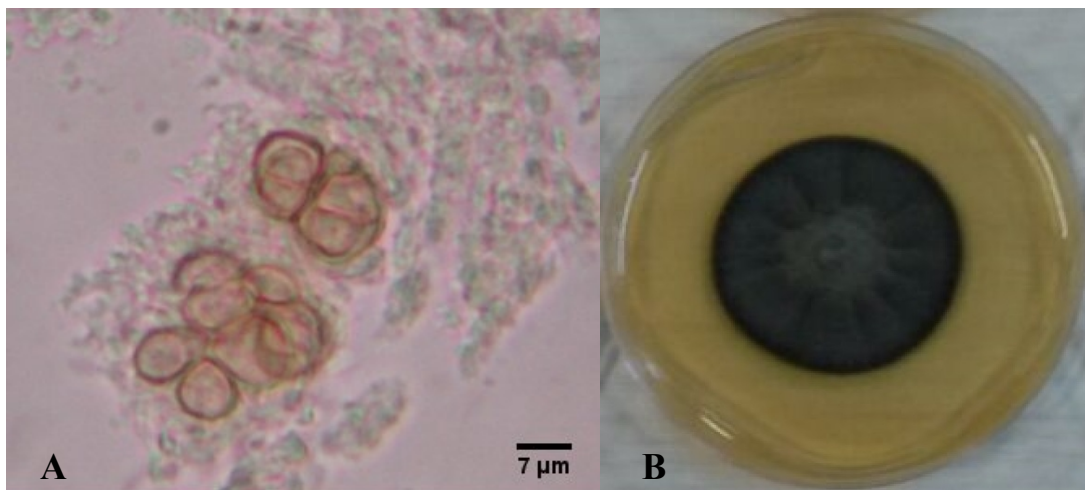


Figura 6. Agentes da cromoblastomicose nos exames micológicos direto e cultural. Células escleróticas observadas por microscopia óptica (400X) no exame micológico direto com KOH 20% (A); Colônia de agente da cromoblastomicose em meio ágar Sabouraud dextrose crescidas durante 28 dias à 30°C (B).

Fonte: autoria própria

cloranfenicol e cicloheximida, há formação de colônias de pigmentação escura e crescimento lento em até seis semanas (**Figura 6B**). O exame microscópico da cultura permite identificação ao nível do gênero pela diferença na estrutura do corpo de frutificação e dos conídios de cada gênero (**Figura 2**) [1].

A região ITS do rDNA tem sido amplamente utilizada em pesquisa [1,16]. São utilizadas árvores filonegéticas para diferenciação de *F. pedrosoi* e *F. monophora* enfatizando esta região de rDNA [104], mas um gene adicional como o fator de alongamento de tradução 1 α (*translation elongation factor 1- α* -TEF-1 α) ou β -tubulina (*β -tubulin*-BT2) foram recomendados para distinção de espécies *Fonsecaea* ou *Phialophora* [16,105].

2.7 Tratamento

Dos antifúngicos orais, o medicamento padrão é o ITZ. Porém, a taxa de cura varia de 15 a 80% dos casos [12,19,20,21,22]. Como os outros triazólicos, o ITZ inibe a biossíntese do ergosterol da membrana celular via esterol 14- α - desmetilase [106]. As doses recomendadas para adultos variam de 200 a 400 mg/dia, com duração variável de tratamento, mas a maioria dos casos mostra melhora dentro de oito a dez meses [21]. Porém, é sujeito a recidivas, podendo, em alguns casos, ocorrer a instalação de formas crônicas, extremamente resistentes à terapia [7,107,108].

A TRB é o medicamento de segunda escolha, com taxas de cura semelhantes as do ITZ [23-25] e apresenta baixas interações medicamentosas. As doses recomendadas são de 250 a 500 mg dia, com duração variável até que a cura micológica ou a resolução das lesões seja alcançada [1].

Em relação à associação de terapias, estão sendo utilizados tratamentos farmacológicos aliados a algum tratamento físico, como crioterapia com nitrogênio líquido [109-111] ou fototerapia [112-114], o que reduz a duração do tratamento antifúngico, levando a uma menor toxicidade ao paciente e menores custos de tratamento. A avaliação dessas terapias em combinação a outros antifúngicos é recomendada, visto que somente ITZ e TRB foram avaliados até o momento [109-112,114]. Há também outro estudo utilizando a TRB e o ITZ [113] combinados à terapia fotodinâmica, apresentando sucesso.

Dentre os métodos físicos, sem dúvida, a cirurgia é o melhor para o tratamento da CBM e é fortemente recomendada para todos os pacientes com lesões cutâneas

pequenas e bem delimitadas. A cirurgia também pode ser utilizada em conjunto com o tratamento empregando o ITZ ou a TRB [1].

2.8 Ensaio de suscetibilidade aos antifúngicos

Para abordar o tema de suscetibilidade aos antifúngicos de agentes da CBM, foram incluídos 39 artigos (conforme citado na **Figura 1**).

Os ensaios de suscetibilidade a antifúngicos não são frequentemente utilizados na prática clínica, principalmente devido à falta de estudos clínicos que correlacionem resultados *in vitro* - *in vivo* para estabelecer perfil de sensibilidade aos antifúngicos [115]. Porém, os ensaios de atividade antifúngica *in vitro* têm avançado consideravelmente devido à disponibilização do primeiro protocolo para teste com fungos filamentosos em 1998, o M38-P pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) [116], na época chamado de *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) e versões mais completas foram disponibilizadas por essa Organização em 2002 e 2008, com os protocolos M38-A e M38-A2, respectivamente [117,118]. Foram encontrados nesta busca 10 artigos realizados antes da propagação da metodologia de padronização específica para fungos filamentosos, e até mesmo depois dela [119], os quais não apresentam padrão metodológico entre eles, o que torna difícil a correlação de resultados. No intuito de padronizar as amostras avaliadas, alguns destes trabalhos utilizaram um dos protocolos M27-P ou M27-A [120,121], disponíveis em 1992 e 1997, respectivamente, que abrangiam suscetibilidade de leveduras a antifúngicos, utilizando adaptações para fungos filamentosos [122,123]. Estudos que utilizaram as metodologias descritas nas versões M38 [116-118], específicas para fungos filamentosos, somam 29, sendo que os mesmos e os demais 10 artigos estão apresentados na **tabela 1**, que é composta das seguintes informações quando citadas nos artigos: identificação das espécies por análise do DNA (*); protocolo ou metodologia utilizada; padronização do inóculo; concentração final de conídios no teste; número de isolados avaliados; medida de distribuição utilizada para apresentação dos resultados e seguindo a seguinte ordem de prioridade para comparação: mediana, média geométrica, mínimo-máximo; resultados das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) obtidas dos antifúngicos avaliados em cada estudo; número de isolados totais e CIMs mínimos e máximos, avaliando todos os estudos que utilizaram versões do M38 como metodologia padrão, descrita como “Total (M38)”.

Tabela 1. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e Concentrações efetivas mínimas (CEMs) de antifúngicos contra agentes da cromoblastomicose e metodologias descritas nos 39 estudos encontrados na literatura até janeiro de 2017.

Protocolo / Metodologia	Padronização do inóculo	UFC/mL(x10 ⁴)***	n	Distribuição	CIM (µg/mL)											CEM (µg/mL)			Referência
					TRB	VRZ	PSZ	KTZ	ITZ	AMB	FCZ	ISZ	RVZ	MCZ	5-FC	CAS	ANI	MFG	
<i>F. pedrosoi</i> *																			
M38-A2	530nm**	1,5-4	21	Mediana		0,5	0,063		0,063	1	32	0,25				4	8	26	
M38-A2	Neubauer	0,4-5	10	Mediana	0,015	0,125	0,125		0,03	4								124	
M38-A		2,5	11	MG	0,049				0,427	2,198								28	
M38-A2	530nm**	1,5-4	1		2	2	0,25		0,5	2	>64					8	8	27	
E-test			3	Mediana		0,012			0,125	>32	>256					>32		29	
		Total (M38)	43	Min-máx	0,02-2	0,012-2	0,03-0,25		0,015-0,63	0,5-4	8->64	0,06-0,25				2-8	2-8		
<i>F. monophora</i> *																			
M38-A2	530nm**	1,5-4	25	Mediana		0,063	0,031		0,063	1	16	0,125				2	4	26	
M38-A2	530nm	0,4-5	1		0,125			0,5	1									114	
M38-A2	530nm**	1,5-4	1		0,125	1			0,125	2								104	
M38-A2	530nm**	1,5-4	1		2	1	0,063		0,125	2	64					8	4	27	
M38-A2		0,4-5	1		0,125	0,06			1									113	
E-test			3	Mediana		0,016			0,125	>32	>256					>32		29	
		Total (M38)	29	Min-máx	0,125-2	0,063-1	0,016-0,06	0,5	0,03-0,25	0,5-2	8-64	0,06-1				1-8	1-8		
<i>F. nubica</i> *																			
M38-A2	530nm**	1,5-4	9	Mediana		0,25	0,031		0,125	1	16	0,125				2	2	26	
		Total (M38)	9	Min-máx		0,25-0,5	0,03-0,06		0,03-0,25	0,5-2	16-32	0,06-0,5				2-4	2-8		
<i>Fonsecaea</i> spp.																			
M38-A2	530nm**	1,5-4	44	Mediana	0,125			0,25	0,19	4								125	
M38-A			10	MG					0,61								45,25	126	
M-38A	Neubauer	1-5	8	MG		0,35	0,32		0,19		22,62		0,22					127	
M-38A	530/T:80-82%	0,4	4	Mediana		0,375				3							1,5	128	
M38-A			1			0,2			0,025	3,1	19	0,39						129	
M27-A	McFarland: 0,5	1-5	20	MG		0,08			0,07	0,28								123	
			15	Mediana					1									21	
Ágar diluição	Neubauer		14	MG	<0,09			0,38	1,46	>64	>128				>100			119	
Macrodiluição	530/T:95%	0,1-1	12	MG					0,091	1,498	>30,2				35,636			130	
M27-P adap	Neubauer	5	9	MG					0,329	2	9,332				11,571			122	
Ágar diluição			3	Min-máx		<0,03			<0,03-0,06									131	
Ágar diluição	Neubauer		1					1	0,1									132	
Ágar diluição			1						>12,5	3,12					25			133	
Macrodiluição	520/T=90%		1						1,95									134	
		Total (M38)	67	Min-máx	0,03-0,25	0,125-0,5	0,25-1	0,06-1	0,025-1	0,5-16	16-64	0,39	0,125-0,5			0,5-4	16-64		

continua

Protocolo / Metodologia	Padronização do inóculo	UFC/mL(x10 ⁴)***	n	Distri-buição	CIM (µg/mL)										CEM (µg/mL)			Referência
					TRB	VRZ	PSZ	KTZ	ITZ	AMB	FCZ	ISZ	RVZ	MCZ	5-FC	CAS	ANI	
<i>C. carrionii*</i>																		
M38-A2			81	Mediana	0,031	0,125	0,016		0,031	2	32	0,125				2	0,25	135
M38-A2	Neubauer	0,4-5	29	Mediana	0,03	0,5	0,125		0,125	4								136
M38-A		2,5	22	MG	0,019				0,315	3,029								28
		Total (M38)	132	Min-máx	0,008-2	0,016-1	0,016-0,25		0,008-1	0,5->8	4-64	0,016-1				0,25-4	0,016-8	
<i>C. bantiana</i>																		
M38-A	530nm**	0,4-5	3	Min-máx		0,12-0,5	<0,007-0,06		<0,007-0,5	0,12-1			0,2-1					137
M38-P	T: 60-82% McFarland:	0,05-0,45	3	MG		0,5			0,21	0,5								138
M27-A	0,5	1-5	24	MG		0,2			0,04	0,21								123
Ágar diluição			7	Min-máx		0,12-1			<0,03-1									131
M27-P adap	Neubauer		5	1					1,95	16	64				25			122
Macrodiluição	530/T:95%	0,05-0,25	1					0,06	<0,03	0,06	4			0,25	0,25			139
		Total (M38)	3	Min-máx		0,12-0,5	<0,007-0,06		<0,007-0,5	0,12-1				0,2-1				
<i>Cladophialophora spp.</i>																		
M-38A	Neubauer	15-40	35	Mediana	0,0075	0,06			0,015	8	8			0,25				140
M-38A	Neubauer	1-5	17	Mediana		0,25	0,25		0,25		16		0,25					127
M38-A2	530nm** McFarland:	1,5-4	6	Mediana	0,125			0,125	0,09	5								125
M27-A	0,5	1-5	22	MG		0,05			0,03	1,07								123
M27-P adap	Neubauer		5	2	Min-máx				0,24	2	16-32				3,12-50			122
		Total (M38)	58	Min-máx	0,004-1	0,015-0,5	0,06-0,5	0,06-0,5	0,007-0,5	4-32	0,5-64		0,125-0,5		0,06-8			
<i>P. verrucosa*</i>																		
M38-A2	Neubauer	2,5	31	Mediana	0,125	1	0,25		2	4	32			16	8		8	141
M38-A		2,5	20	MG	0,068				0,691	3,335								28
		Total (M38)	51	Min-máx	0,002-1	0,06-1	0,03-1		0,25-2	2-4	8-256			2-256	2-16		0,5-32	
<i>Phialophora spp.</i>																		
M38-A2	530nm** 530/T:80-82%	1,5-4	6	Mediana	0,09			0,75	0,19	8								125
M38-A		0,4	5	Mediana		1				2						0,125		128
M38-A			1			0,2			0,1	1,56	11	0,2						129
M27-P adap	Neubauer		5	2	Min-máx				0,97-1,95	1-4	32			6,25-12,5				122
M27-A	0,5	1-5	25	MG		0,12			0,07	0,36								123
		Total (M38)	12	Min-máx	0,06-0,125	0,125-1		0,5-2	0,125-0,25	2-8	11	0,2				0,03-0,25		

continua

Protocolo / Metodologia	Padronização do inóculo	UFC/mL(x10 ⁴)***	n	Distribuição	CIM (µg/mL)										CEM (µg/mL)			Referência
					TRB	VRZ	PSZ	KTZ	ITZ	AMB	FCZ	ISZ	RVZ	MCZ	5-FC	CAS	ANI	
<i>E. spinifera</i> *																		
M38-P	Neubauer	1	23	MG	0,26	0,3			0,05	0,7	55,05					3,44	142	
M38-P	Neubauer	0,5	8	MG	0,3	0,27			0,06	0,92	45,25					5,66	143,144	
M38-A		1-4	8	Mediana		0,25	<0,015		0,03	0,5							30	
M38-A2	530nm**	0,4-5	1		2			0,5	0,25	4							145	
M38-A2	530nm**	0,4-3,1	1			0,5	0,063		0,125	0,5	16					4	2	146
		Total (M38)	41	Mín-máx	0,03-2	0,03-1	<0,015-0,03	0,5	<0,015-0,25	0,125-4	16-128				0,125-128			
<i>E. xenobiotica</i> *																		
M38-A		1-4	39	Mediana		1	0,03		0,125	0,5							30	
M38-A2	530/T:80-82%	0,4-5	2	Mín-máx		0,06-1			0,12	0,5						1-4	147	
		Total (M38)	41	Mín-máx		<0,015-2	<0,015-0,06		<0,015-1	0,125-1						1-4		
<i>Exophiala</i> spp.																		
M38-P	530nm**		9	Mediana	0,06	0,125			0,125	0,25				0,5			148	
M38-A2	530/T:80-82%	1,5-4	2	Mediana	2			0,75	0,25	4							125	
M38-A			1			0,39			0,013	1,56	36	0,78					129	
M27-A	McFarland: 0,5	1-5	9			0,21			0,11	0,7							123	
		Total (M38)	12	Mín-máx	0,03-2	0,03-39		0,5-1	0,03-0,5	0,125-4	36	0,78		0,125-1				
<i>R. aquaspersa</i> *																		
M38-A2	530nm**	0,25-2	3	Mín-máx		2	0,125		0,06-0,125	1-2	32-64	2				8	1	149
M38-A2	Neubauer	0,4-5	1		0,06	1	0,25		0,125	2								150
		Total (M38)	4	Mín-máx	0,06	1-2	0,125-0,25		0,06-0,125	1-2	32-64	2				8	1	
<i>Rhinochadiella</i> spp.																		
M38-A2	530nm**	1,5-4	2	Mediana	0,19			1,5	0,31	4							125	
M27-A	McFarland: 0,5	1-5	2	Mín-máx		0,03-0,25			0,03-0,06	0,06-1							123	
M27-P adap	Neubauer	5	2	Mín-máx					0,97	2-8	8-16				6,25-25		122	
		Total (M38)	2	Mín-máx	0,125-0,25			1-2	0,125-0,5	4-4								

*Com identificação molecular.

**Abs = 0,15-0,17% ou Trans = 68-71%.

*** Protocolo M38-A2 do CLSI preconiza 0,4-5x10⁴/mL para fungos filamentosos não dermatófitos.

TRB: terbinafina; VRZ: voriconazol; PSZ: posaconazol; KTZ: cetoconazol; ITZ: itraconazol; AMB: anfotericina B; FCZ: fluconazol; ISZ: isavuconazol; RVZ: ravuconazol; MCZ: miconazol; 5-FC: 5-flucitosina; CAS: caspofungina; ANI: anidulafungina; MFG: micafungina.

MG: média geométrica

Na determinação da CIM do FCZ, é considerada inibição de 50% em comparação com controle de crescimento sem antifúngico. Já para os demais antifúngicos, 100% de inibição tem sido usado para os agentes da CBM [26]. Ao comparar as CIMs dos antifúngicos, as mais baixas sugerem melhor atividade em relação ao isolado analisado [115]. Porém, não há pontos de corte estabelecidos que sejam baseados em estudos clínicos comparativos relacionando resultados *in vitro* e resposta *in vivo* para determinação de sensibilidade e resistência aos antifúngicos para agentes da CBM [118]. Entretanto, alguns autores têm utilizado para esses agentes, pontos de cortes propostos no protocolo ou em estudos para outros fungos filamentosos. Por exemplo, González et al. [136,150] utilizaram CIM < 1 µg/mL como representativo de sensibilidade aos fármacos, 2 µg/mL como intermediário e ≥ 4 µg/mL como resistentes ao ITZ, posaconazol (PSZ), voriconazol (VRZ), anfotericina B (AMB) (incluídos no M38-A2, juntamente com a concentração efetiva mínima -CEM- da caspofungina) e TRB (não incluído na classificação do protocolo). Já Yamaski et al. [129], utilizou outras classificações, sendo amostras consideradas sensíveis ao ITZ quando CIM ≤ 0,125 µg/mL e resistentes, CIM ≥ 1 µg/mL; sensíveis ao VRZ e isavuconazol quando CIM ≤ 1 µg/mL e resistentes, CIM ≥ 4 µg/mL; e sensíveis ao FCZ quando CIM ≤ 8 µg/mL e resistentes, CIM ≥ 64 µg/mL.

Levando em consideração os pontos de corte propostos no protocolo M38-A2 do CLSI e o ponto de corte sugerido para o FCZ [129], ao analisar aos 39 estudos encontrados na **Tabela 1**, podemos fazer as seguintes considerações:

- ITZ foi o antifúngico mais avaliado, somente um estudo dos trinta e nove não avaliou este antifúngico em agentes da CBM, sendo que todas as amostras mostraram-se sensíveis ou com resposta intermediária a este antifúngico;
- Todas as amostras avaliadas dos agentes da CBM foram consideradas sensíveis ou com resposta intermediária à TRB, ao VRZ, ao PSZ, sendo que a TRB apresentou isolados com as CIMs mais baixas nos ensaios. Porém, não foi avaliada em *F. nubica*, *C. bantiana* e *E. xenobiotica*;
- A CIM de cetoconazol (KTZ) foi ≤ 2 µg/mL para todas as amostras testadas. Porém, em nível de espécie, só foram avaliadas *F. monophora* [114] e *E. spinifera* [145];
- A grande maioria das amostras foi considerada resistente ao FCZ;
- Algumas amostras mostraram resistência à AMB nas espécies: *F. pedrosoi* [29,114,124]; *F. monophora* [29]; *C. carrionii* [28, 135, 136]; *P. verrucosa* [28,141]; *E. spinifera* [142,145];

- O isavuconazol foi avaliada nos cinco gêneros, sendo que para *R. aquaspersa*, teve resultado intermediário de sensibilidade;
- O ravuconazol não foi avaliado em *Exophialia* spp. e *Rhinocladiella* spp., e nos demais gêneros, apresentou CIM $\leq 1 \mu\text{g/mL}$, mas não há sugestão para pontos de corte para este antifúngico;
- O miconazol foi avaliado somente em *C. bantiana* e *Exophiala* spp., também apresentando CIM $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ e sem ponto de corte sugerido;
- Para 5-flucitosina, CIM $> 64 \mu\text{g/mL}$ está relacionado à resistência [118]. Para *Cladophialophora* spp., este antifúngico pode ser considerado sensível. Porém, houve isolados de *P. verrucosa* e *E. spinifera* resistentes a este antifúngico, a suscetibilidade dos demais gêneros/espécies de agentes CBM utilizando os protocolos M38 do CLSI não foi avaliada para este antifúngico e quando outras metodologias foram utilizadas, a CIM deste antifúngico foi aumentada consideravelmente.
- Todos os níveis de sensibilidade são encontrados para caspofungina em quatro dos gêneros de agentes da CBM, com maior prevalência de amostras resistentes. As três amostras de *R. aquaspersa* avaliadas foram consideradas resistentes a este antifúngico;
- A anidulafungina teve resultados semelhantes à caspofungina, mas com CIMs inferiores contra *Phialophora* spp. e *R. aquaspersa*;
- Nos poucos estudos com micafungina, este antifúngico apresentou, geralmente, CIMs elevadas;

As três equinocandinas avaliadas (caspofungina, anidulafungina e micafungina), provavelmente terão uso limitado, devido às altas concentrações de antifúngico necessárias para inibição dos fungos em comparação com azólicos e TRB, além da disponibilização de poucas formulações orais de alto custo [26].

Houve diferença de suscetibilidade aos antifúngicos nos gêneros distintos. O gênero *Rhinocladiella* obteve CIMs maiores de KTZ que os demais gêneros [125]. Também foi visto que isolados de *C. carrionii* [28] e *Exophiala* spp. [125] apresentaram, respectivamente, CIMs menores e maiores de TRB comparada com *F. pedrosoi* e *Phialophora* spp.. Além disso, *Cladophialophora* spp. foi mais sensível ao ITZ [28] e ao KTZ [125] que *Phialophora* spp.

Foram encontrados quatro estudos que realizaram teste de suscetibilidade a antifúngicos utilizando diferentes espécies do mesmo gênero, sendo que três avaliaram espécies de *Fonsecaea* [26,27,29] e um de *Exophiala* [30]. Dois desses trabalhos citaram que não houve diferença de suscetibilidade entre as espécies do gênero

Fonsecaea [26,29]. No entanto, nenhum deles confirmou por análise estatística. Assim, estudos que relacionem com suporte estatístico igualdades e diferenças de suscetibilidades a antifúngicos entre espécies de cada um dos gêneros de agentes da CBM são importantes para a determinação da necessidade de identificar em nível de espécie na clínica com o intuito de utilização de tratamento diferenciado para cada das espécies.

Neste sentido, é importante ressaltar que há agentes da CBM que não passaram por testes de suscetibilidade após avaliação molecular para confirmação ou identificação em nível de espécie, como *C. bantiana* e *P. americana*, sendo importante a identificação para comparação entre os resultados da sensibilidade aos antifúngicos das diferentes espécies.

2.9 Identificação de fungos por Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A identificação de agentes da CBM a partir da análise de DNA envolve vários passos (extração de DNA, amplificação de uma ou mais regiões de DNA, purificação, sequenciamento, análise de sequenciamento, comparação da sequência em banco de dados e, se necessário, avaliação de árvore filogenética) que, além de consumir tempo, os custos relacionados aos reagentes em cada fase levaram à busca de novas ferramentas para identificar microrganismos. Neste sentido, as ferramentas de metabolômicas estão sendo utilizadas, como a espectrometria de massa chamada *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight* (MALDI-ToF MS) e FTIR [151], sendo que a última é mais fácil e rápida, uma vez que as células intactas são utilizadas na técnica, enquanto que a extração de proteínas é necessária para a análise MALDI-ToF MS.

FTIR é um método físico-químico analítico baseado na interação entre luz e matéria que permite a caracterização dos níveis de energia vibracionais atômicas presentes em uma amostra [152]. A transformação de Fourier é um meio matemático de identificar as frequências individuais para a representação final de um espectro no infravermelho (IV) [17], que permite atribuir, de forma qualitativa e quantitativa, o sinal aos principais constituintes macromoleculares (polissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas, etc.) [152]. A **tabela 2** mostra algumas bandas frequentemente encontradas em espectros de

IV em microrganismos, descrevendo os picos obtidos de espectros de segunda derivada apresenta das por Neumann [17].

Tabela 2. Interpretação de algumas bandas frequentemente encontradas em espectros no infravermelho microbiano 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 ₂
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 simétrico de >CH ₂ em ácidos graxos
1741	>C=O estiramento de ésteres
1715	>C=O estiramento de ésteres, RNA/DNA, -COOH
~1695, 1685, 1675	amida I: folha pregueada antiparalela ou voltas β das proteínas
~1655	amida I de estrutura α-hélice
~1637	amida I de folha β pregueada
1548	amida II
1515	banda de tirosina
1468	C-H: deformação de >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 C-O-P, P-O-P
1085	P=O: estiramento simétrico de >PO ₂ ⁻
720	C-H <i>rocking</i> de >CH ₂
900-600	Região <i>Fingerprint</i>

Fonte: Neumann [17].

O espectro de IV representa uma "impressão molecular" global que pode ser utilizada para a caracterização, diferenciação e identificação de microrganismos, incluindo fungos [153]. A região IV é subdividida nas regiões do IV próximo (*NIR*), do IV médio (*MIR*) e do IV distante (*FIR*). O MIR é a região mais utilizada para a identificação microbiana [17], e nessa região, os modos vibracionais moleculares são medidos e envolvem comprimentos de números de onda entre 2,5 e 25 micrômetros, correspondendo ao intervalo de onda de 4000-400 cm⁻¹ [153].

A espectroscopia FTIR tem alta sensibilidade, é rápida, econômica, fácil de usar e é aplicável a vários campos da biologia de sistemas [154]. Além desta elevada capacidade de identificação de microrganismos, os espectros de IV também são úteis para: detectar compostos intracelulares *in situ* ou estruturas, tais como, corpos de inclusão, materiais de armazenamento e endosporos; monitorar e quantificar o dióxido de carbono (CO₂) liberado em resposta a diferentes substratos; e caracterizar fenômenos dependentes do crescimento e das interações célula-fármaco [17].

Embora as primeiras experiências usando FTIR para analisar microrganismos remontam aos anos 1950 [155], passou a ser usada rotineiramente 40 anos depois, devido ao desenvolvimento de espectrômetros sofisticados e computadores potentes que permitiu a análise dos espectros. Naumann, Helm e seus colaboradores [156-159], reintroduziram a técnica em 1991 e lançaram as bases para a aplicação da espectroscopia de IV, descrevendo os procedimentos fundamentais para a preparação de amostras e avaliação de dados, que precisam ser rigorosamente padronizados para desenvolver um robusto método validado de identificação rotineira de microrganismos em diferentes laboratórios [17,152,154]. Esse método fornece informações sobre a composição química geral das células e, portanto, também refletem mudanças na composição celular induzidas por alterações em condições, tais como: o tipo de meio, a temperatura e o tempo de crescimento [158-161]. Além disso, as configurações de parâmetros usados para registrar os espectros, tais como, a resolução e o número de varreduras, também precisam ser mantidas constantes [162], sendo que estes procedimentos de aquisição e avaliação de dados já foram publicados [157-159,162]. As amostras microbianas adequadas para medições por IV podem ser obtidas a partir de culturas líquidas ou diretamente de placas de meio sólido, que podem ser medidas como grânulos hidratados ou películas secas aplicando as técnicas de Absorção/Transmissão (*A/T*), Absorbância/Refletância (*A/R*), Reflexão Total Atenuada (*ATR*) e Reflexão Difusa (*DRIFTS*) [17,162].

Existe um protocolo para o uso da técnica *A/T*, em que uma gota de suspensão microbiana é desidratada sobre um agente de secagem aplicando vácuo suave a moderado para formar discos de película transparente. Este procedimento também pode ser realizado na medida *A/R*. Em *DRIFTS* as amostras biológicas são liofilizadas [17], já os procedimentos de preparação da amostra para o *ATR* incluem: transferência direta de amostras de fungos como películas finas; técnicas de “carimbo” onde as placas ópticas são levemente pressionadas contra amostras de fungos; e análise direta de amostras de

fungos sob pressão externa para assegurar um bom contato das amostras com o cristal de diamante do *ATR* [163]. Uma variante técnica das medições de transmissão é a microscopia FTIR, onde o espectrômetro é acoplado a um microscópio de luz equipado com objetivas *Cassegrain* e detectores sensíveis de mercúrio e cádmio. Nessa técnica, os espectros de alta qualidade podem ser registrados a partir de pequena quantidade de amostra [164].

Apesar do protocolo sugerido para uso de *A/T* para microrganismos e a possibilidade de utilização de *A/R* e *DRIFTS*, estas técnicas utilizam as amostras em forma de pó ou trituradas na forma úmidas no intuito de manter a homogeneidade das mesmas para as análises [17]. Por isso, não são interessantes para uso em amostras de fungos filamentosos, já que os esporos podem ser facilmente dispersos no ambiente durante a manipulação do liofilizado ou trituração, não sendo recomendados, principalmente, quando os mesmos são patogênicos, acarretando em alto risco para o laboratorista. Neste sentido, técnicas de *ATR* vêm a favor da segurança laboratorial, visto que pequena preparação de amostra é necessária para estas medições [162].

Os espectros de FTIR microbianos são impressões digitais muito complexas e requerem tratamento extensivo de dados para obter resultados confiáveis de identificação ou classificação para um modelo estabelecido. Os métodos quimiométricos aplicados para a construção de modelos de classificação precisam garantir uma generalização suficiente, o que é particularmente difícil para amostras biológicas, uma vez que os microrganismos exibem diversidade intraespécies e, assim, as características específicas da espécie precisam ser extraídas da quantidade total de variância [162].

O progresso na espectroscopia analítica e a velocidade de aquisição de dados também levaram à construção de conjuntos de dados grandes e complexos. Para explorar esses grandes conjuntos de dados, desenvolveram-se métodos estatísticos sofisticados [153]. O campo da quimiometria emergiu assim como uma abordagem poderosa para a aquisição de dados, interpretação e compreensão. Os recentes avanços em computação e quimiometria permitem escolher uma grande variedade de algoritmos estatísticos para analisar o mesmo banco de dados espectrais [153]. Os mesmos dividem-se em métodos supervisionados e não supervisionados.

Os métodos não supervisionados incluem análise hierárquica de agrupamentos (*HCA*) e análise por componentes principais (*PCA*), que são ferramentas utilizadas para diferenciar espectros sem identificação prévia e obter uma impressão da complexidade,

similaridade e heterogeneidade de conjuntos de dados de composição desconhecida. Assim, se o conhecimento *a priori* sobre um conjunto de dados está disponível, técnicas não supervisionadas são ferramentas úteis para verificar a reprodutibilidade das medições e a separação geral dos grupos. Além disso, as amostras anômalas podem ser detectadas e excluídas do conjunto de dados, um passo crucial antes de ser submetido a uma análise por técnicas supervisionadas. A identificação por métodos não supervisionados é difícil, uma vez que, em geral, não são adequadas para avaliar conjuntos de dados complexos [162].

Para fins de identificação, as técnicas supervisionadas são recomendadas, uma vez que utilizam conhecimento prévio para definir classes e otimizar um modelo [162]. Em alguns estudos [152,165], as amostras fúngicas foram atribuídas a uma classe preestabelecida com base nos resultados genéticos e de acordo com a taxonomia atual (supervisionada por identificação molecular). Existe um grande número de técnicas quimiométricas supervisionadas para analisar e identificar os espectros FTIR, sendo as mais comuns a regressão por mínimos quadrados parciais (*PLS*), a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (*PLSDA*), a de redes neurais artificiais (*ANN*) e um método baseado no cálculo do coeficiente de correlação do momento do produto de Pearson [162]. A regressão *PLS* foi desenvolvida para análise quantitativa, mas também pode ser empregada para identificação de classe usando código numérico. Já no *PLSDA*, utiliza regressão multivariada, pois baseia-se na relação entre as variáveis explicadas das amostras e as diferentes classes das amostras [152].

2.9.1 Identificação de fungos patogênicos humanos por FTIR

Na busca realizada, que está citada na **Figura 1**, estudos de identificação de fungos por FTIR totalizaram 31, sendo que outros quatro estudos citados nos artigos de revisões foram adicionados para compor essa revisão da literatura sobre o tema, totalizando, portanto, 35 artigos.

O potencial da espectroscopia FTIR para a identificação de fungos está bem documentado e a técnica tem sido aplicada em muitos campos diferentes: clínica humana [18,165-175]; fitopatógenos [172,176-180]; fungos relacionados a alimentos [181-187]; e fungos do ambiente relacionados ao ar [188,189], ao mar [190], ao solo [191] e também estudos com fungos encontrados em locais específicos, como casas [163], sujeira preta dos vasos sanitários [192] e fungos decompositores de madeira

[193]. Além desses estudos voltados a estas áreas determinadas, há estudos amplos que compreendem muitos gêneros de fungos que podem estar relacionados tanto ao ambiente, quanto causadores de infecções ou contaminantes de alimentos [152,153,194].

Os estudos realizados com o objetivo de identificar fungos patogênicos humanos estão apresentados na **Tabela 3** e alguns aspectos nela inseridos podem ser discutidos, entre eles, estão:

- Os estudos avaliando fungos patogênicos humanos por FTIR são recentes, sendo o primeiro deles publicado em 1998 por Schmalreck e colaboradores [18];
- Grande parte das leveduras patogênicas já foi avaliada por FTIR, com destaque para o gênero *Candida*, que corresponde a 50% de todos os estudos com fungos patogênicos tiveram como objetivo a diferenciação das espécies deste gênero, sendo utilizada a técnica exploratória HCA com espectro total ou parcial para encontrar semelhanças e diferenças entre as espécies e sugerir inclusão de modelagem para identificação das mesmas;
- Dos fungos filamentosos considerados patogênicos (não oportunistas), somente foram avaliados por FTIR alguns dermatófitos (*Microsporum canis* e espécies de *Trichophyton*), *Paracoccidioides brasiliensis*, *Exophiala phaeomuriformis* e *Exophiala dermatitidis*. A última espécie é causadora de CBM e, portanto, até agora essa foi a única espécie dessa doença avaliada por FTIR com o objetivo de diferenciação para identificação. O único estudo encontrado na literatura que avaliou outros agentes da CBM teve como objetivo a determinação da atividade lipolítica de nove espécies por FTIR supervisionado por ensaio enzimático *in vitro*. Assim, Corbellini e colaboradores, em 2009 [195], demonstraram que modelo de predição enzimático por FTIR pode ser estabelecido para estes agentes.
- Dentre os meios de cultura utilizados para análises em fungos patogênicos está o Ágar Sabouraud (com ou sem antibióticos), que foi utilizado em 86,7% dos ensaios para leveduras. Já para fungos filamentosos patogênicos, existem três meios de culturas diferentes citados na literatura, não havendo uma padronização em relação a este importante fator. Os constituintes de um meio de cultura são refletidos na fisiologia e bioquímica das células fúngicas, o que acarreta em diferenças nos sensíveis espectros de IV, já que as bandas vibracionais estão relacionadas à composição bioquímica completa dessas células [162];

Tabela 3. Estudos de avaliação de fungos patogênicos humanos a partir de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

Morfologia	Gêneros/Espécies analisadas (n)	Preparo da Cultura (Líquido ou Sólido)	Preparo da amostra	Métodos de análises	Referência
Levedura	<i>Candida albicans</i> (150)			HCA nas regiões: 3197-3600/ 698- 902 / 900-1 200 / 1199-1500/ 1498-1801 / 2797-3003 / 3001-3300	18
Filamentoso	<i>Exophiala dermatitidis</i> (22)				
Levedura	<i>Candida albicans</i> (58) e <i>Candida dubliniensis</i> (53)	ASD a 30°C por 24h.	Suspensão de leveduras adicionadas em ZnSe e seco à vácuo	HCA nas regiões: 822 to 799, 920 to 855, 1,090 to 1,050, 1,235 to 1,180, and 1,385 to 1,355 cm ⁻¹ ANN using: 750 to 1,500 cm ⁻¹ .	165
Levedura	<i>Candida</i> spp. (79)	Ágar Sabouraud-gentamicina-cloranfenicol ágar a 37°C por 24 ou 48h.	Suspensão de leveduras adicionadas em ZnSe e seco à vácuo	HCA	166
Levedura	<i>Candida</i> spp. (57)	Para FTIR: Ágar Sabouraud-gentamicina-cloranfenicol a 37°C por 24h.	Suspensão de leveduras adicionadas em ZnSe e seco à vácuo	HCA	167
		Para microespectroscopia: culturas de 10-18h	microcolônias de 50-250 µm como carimbo em ZnSe transparente		
Levedura	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida parapsilosis</i> (10 de cada)	Para FTIR: ASD a 37 °C por 24h	Suspensão de leveduras adicionadas em ZnSe e seco à vácuo	HCA na região: 900–1,200 cm ⁻¹	168
		Para FTIR microespectroscopia: culturas de 10-18h	Microcolônias de 50-250 µm como carimbo em ZnSe transparente		
Levedura	Gêneros <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Trichosporon</i> , <i>Rhodotorula</i> e <i>Geotrichum</i> (total 39)	ASD com cloranfenicol	Alça de leveduras adicionadas a discos de KBr.	HCA nas regiões: 3030–2830, 1350–1200 e 900–700 cm ⁻¹	169

ASD: ágar Sabouraud dextrose

Continua

Filamentosos ou levedura	Gêneros/Espécies analisadas (n)	Preparo da Cultura (Líquido ou Sólido)	Preparo da amostra	Métodos de análises	Referência
Levedura	<i>Malassezia</i> spp. (10)	Dixon ágar modificado	Resuspensão do liofilizado	HCA / PCA	170
Filamentosos	<i>Trichophyton rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> e <i>Microsporum canis</i>	Ágar Kimmig à 22°C por 2 semanas.	Suspensão de colônia total, adicionada em placa e seca.	HCA	171
Filamentosos	<i>Penicillium</i> sp., <i>Memmoniella</i> sp. e <i>Fusarium</i> sp.	Ágar Batata Dextrosado, 37°C.	Suspensão adicionadas em cristal de ZnSe e seco	Comparações estatísticas dos gêneros fúngicos e bacterianos utilizando segundas derivadas das bandas.	172
Filamentoso	<i>Trichophyton</i> spp. (32)	Ágar Kimming	Liofilizado a partir de 1mL de suspensão de colônia total na escala de número 3 de McFarland	HCA / PCA	173
Filamentosos	<i>Exophiala dermatitidis</i> e <i>E. phaeomuriformis</i> (44)	Ágar Kimmig à temperatura ambiente por 4 dias	Suspensão de colônia	HCA / PCA	174
Filamentoso e Levedura	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (1)	Meio Ham's F12 líquido a 25 °C (micélio) e 37 °C (levedura)	Uma gota de suspensão de micélio e de levedura seca em substrato de CaF ₂ .	Comparação das formas celulares pelas segundas derivadas das bandas obtidas.	175

ASD: ágar Sabouraud dextrose

- O preparo das amostras do gênero *Candida* também está melhor padronizado do que o dos fungos filamentosos. As amostras de *Candida* spp. seguiram uma padronização, tanto na avaliação por FTIR quanto por microespectroscopia FTIR. Na avaliação por FTIR, as células foram coletadas do meio de cultura sólido com auxílio de alça e suspensas em água destilada, sendo ajustada a densidade óptica para $3 \pm 0,01$ ($\lambda=500$ nm) e depositada uma alíquota de 35 μ L sobre um suporte de amostra com seleneto de zinco (ZnSe) e dessecada sob um vácuo suave para formar uma película fina de material biológico para as medições, sendo a dessecação necessária para evitar a forte absorção de água na região proteica dos espectros de IV [168]. Já para fungos filamentosos, alguns estudos utilizam turbidimetria para padronização do isolados, seja utilizando espectrofotometria [174] ou escala de McFarland [173]. Em um estudo, é citado o protocolo utilizado, mas no mesmo, a estimativa de concentração não foi levada em consideração [172]. Outro estudo cita uma determinada concentração celular mesmo utilizando suspensão da colônia total e não somente os esporos, que é a estrutura possível de ser quantificada em fungos filamentosos [171]. Já outro, não cita como foi realizada a padronização de células [175]. Deste modo, é possível perceber que há uma falha em relação ao modo de preparo das amostras de fungos filamentosos, sendo este um parâmetro importante para este tipo de análise. Infelizmente, dessa forma, não há como compilar os resultados desses trabalhos em um banco para identificação desses fungos patogênicos.

- Além do problema de padronização de fungos filamentosos, todos os estudos citados na **Tabela 2** apresentam alta probabilidade de contaminação do ambiente de trabalho, devido ao preparo de suspensões serem procedidas de forte agitação das células e adicionadas em superfície aberta, causando aerossóis de esporos. Se a manipulação desses fungos for realizada, em qualquer de suas etapas, fora da câmara de fluxo laminar vertical (equipamento de segurança que impede a saída de ar do equipamento), haverá riscos ao manipulador e às demais pessoas que possam entrar em contato com o ar contaminado. Nos casos destes fungos, poderia ter sido usada a técnica *ATR*, assim como utilizada para fungos ambientais [163,192], com as culturas intactas (sem agitações) entrando em contato direto com o cristal de diamante do equipamento, diminuindo a liberação de esporos para o ambiente.

- Somente para *C. albicans* e *C. glabrata* foi proposto um modelo de identificação por FTIR até o momento, visto que somente no estudo de Tintelnot et al. [165], foi utilizada técnica *ANN*, supervisionada por identificação molecular das amostras. Assim, para

outras leveduras e fungos filamentosos, como a técnica escolhida não foi supervisionada (*HCA*), foram observadas diferenças de algumas bandas de IV entre as espécies testadas, apresentando possibilidade de modelagem para identificação que viria em um próximo passo utilizando técnicas supervisionadas, como *ANN* ou *PLS*. Além disso, em dois seis trabalhos com fungos filamentosos não foram utilizadas técnicas desenvolvidas para FTIR, e sim análises estatísticas ao comparar as segundas derivadas das bandas dos espectros de IV [172,175].

Portanto, a utilização de FTIR em combinação com técnicas quimiométricas para identificação de fungos patogênicos pode ter um grande potencial para ser utilizado em laboratórios clínicos, pois apresenta vantagens em relação à identificação micromorfológica e sequenciamento de uma porção do DNA, gerando maior rapidez na obtenção de resultados e menores custos laboratoriais. Porém, a padronização de todas as etapas, desde o preparo das amostras até a avaliação dos espectros, deve ser rigorosa para que um banco de referência espectral possa ser confiável e reprodutível.

2.10 Melanina

Melanina é considerada como um grande grupo de pigmentos que têm propriedades semelhantes, sendo geralmente marrons a pretas, com peso molecular elevado, altamente estável, amorfo, carregado negativamente, resistentes à degradação pelos ácidos, mas susceptíveis à degradação com bases fortes, hidrofóbicos, insolúveis em água ou solventes orgânicos, e formados por polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos [196].

As melaninas são distribuídas em todos os reinos biológicos [196], sendo que os fungos melanizados, também chamados de "leveduras negras" e suas representativas formas filamentosas, podem causar a CBM, a PHM e o micetoma em humanos [197]. A melanina não é essencial para o crescimento e desenvolvimento dos fungos, sendo considerada metabólito secundário [197,198], mas é fator de virulência e patogenicidade importante no desenvolvimentos destas doenças [197]. Já foi visto que a melanina, presente na parede das células vegetativas e parasitárias dos agentes da CBM, atua na proteção destes contra os fatores ambientais agressivos e como fator de virulência, estando relacionada com o padrão de resposta inflamatória granulomatosa e à cronicidade da doença [108,199].

Para abordar o tema sobre melanina em agentes da CBM, foram incluídos 22 artigos (conforme citado na **Figura 1**) e adicionadas referências relevantes citadas nos mesmos.

2.10.1 Biossíntese e inibição de melanina em agentes da cromoblastomicose

Em 1999, Franzen e colaboradores [200], utilizando microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia confocal (CLSM), descreveram os estágios de produção e estocagem de melanina em melanossomos até a fusão dos mesmos com a membrana plasmática e parede celular para deposição dos grânulos de melanina. Nove anos depois [201], os autores detectaram, pela coloração de prata, que a deposição do polímero na parede celular ocorre de forma concêntrica, e que a melanina apresenta alta afinidade por ferro, sendo o mesmo, juntamente com cálcio e fósforo, encontrado nos melanossomos. Estas organelas podem servir como um reservatório de cálcio, assim como os de mamíferos, sugerindo que a liberação de cálcio juntamente com a melanina na parede celular possa estimular a diferenciação de conídios e hifas em células escleróticas de *Fonsecaea* sp., pois a capacidade de influenciar a transformação das formas vegetativas em células parasitárias já foi evidenciada em outros estudos [202-204].

Em relação aos tipos de melaninas encontradas na natureza, são citados: derivados de levodopa (3,4-di-hidroxi-L-fenilalanina) (L-DOPA), que são chamados eumelaninas e apresentam cor negra; melanina amarela ou avermelhada, as quais são chamadas feomelaninas ao incorporar cisteína com L-DOPA; piomelaninas, que são formados por compostos de ácido homogentísico de tirosinase e tem cor amarronzada; melaninas de di-hidroxinaftaleno (DHN), derivados de acetatos e são geralmente negras ou castanhas; e neuromelanina, produzida por oxidação das catecolaminas dopamina e norepinefrina e é encontrada no *locus ceruleus* de humanos, primatas e carnívoros [196] (**Figura 7**).

Em fungos, as melaninas são nomeadas de acordo com sua composição e via de síntese, sendo que as melaninas mais citadas com relação com a patogênese dos fungos são di-hidroxifenilalanina (DOPA) e 1,8-di-hidroxinaftaleno (DHN) [197,205]. Os agentes da CBM possuem a melanina DHN [206,207], assim como diversos fungos patogênicos, tais como: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* e *Hortaea werneckii* [208,209]. Um inibidor específico da produção deste tipo de melanina é o 5-metil-1,2,4-triazol[3,4] benzothiazol (triciclazol) [202], que tem sido utilizado em experimentos

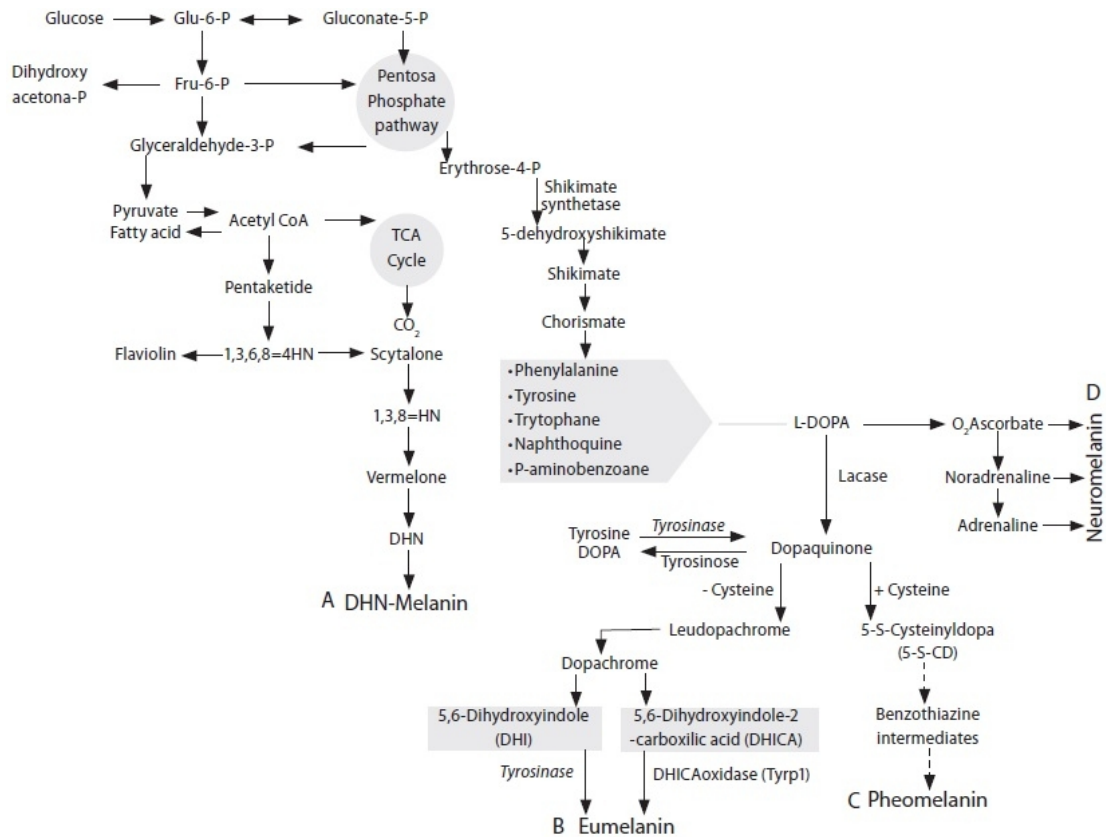


Figura 7. Vias metabólicas para a síntese de melanina a partir de vários precursores e geração de melanina di-hidroxinaftaleno (DHN) (A), eumelanina (B) feomelanina (C) e neuromelanina (D).

Fonte: Úran et al., 2008 [196]

para inibição de DHN melanina *in vitro* de amostras desses fungos, sendo que em *Exophiala dermatitidis* e em *Fonsecaea* spp. as concentrações finais utilizadas são na faixa de 16-50 µg/mL em meios de cultura [34,35,202,208,210]. Foi visto que, durante o crescimento de *E. dermatitidis* com o inibidor de melanina, houve o acúmulo de scitalona, flaviolina, 3,3'-biflaviolina e 2-hidroxijuglona (2-HJ) [210], que são metabólitos da via de biossíntese de DHN melanina (**Figura 8**) com a subsequente alteração das colônias de preto acinzentadas (sem o inibidor de melanina) para marrom avermelhada, cor essa também evidenciada no meio de cultura pela liberação de intermediários (**Figura 9**) [208].

O triciclazol tem sido utilizado na agricultura para impedir a produção de micotoxinas, com a inibição da aflatoxina redutase que está envolvida na conversão da versicolorina A em esterigmatocistina, interrompendo, portanto, a produção de

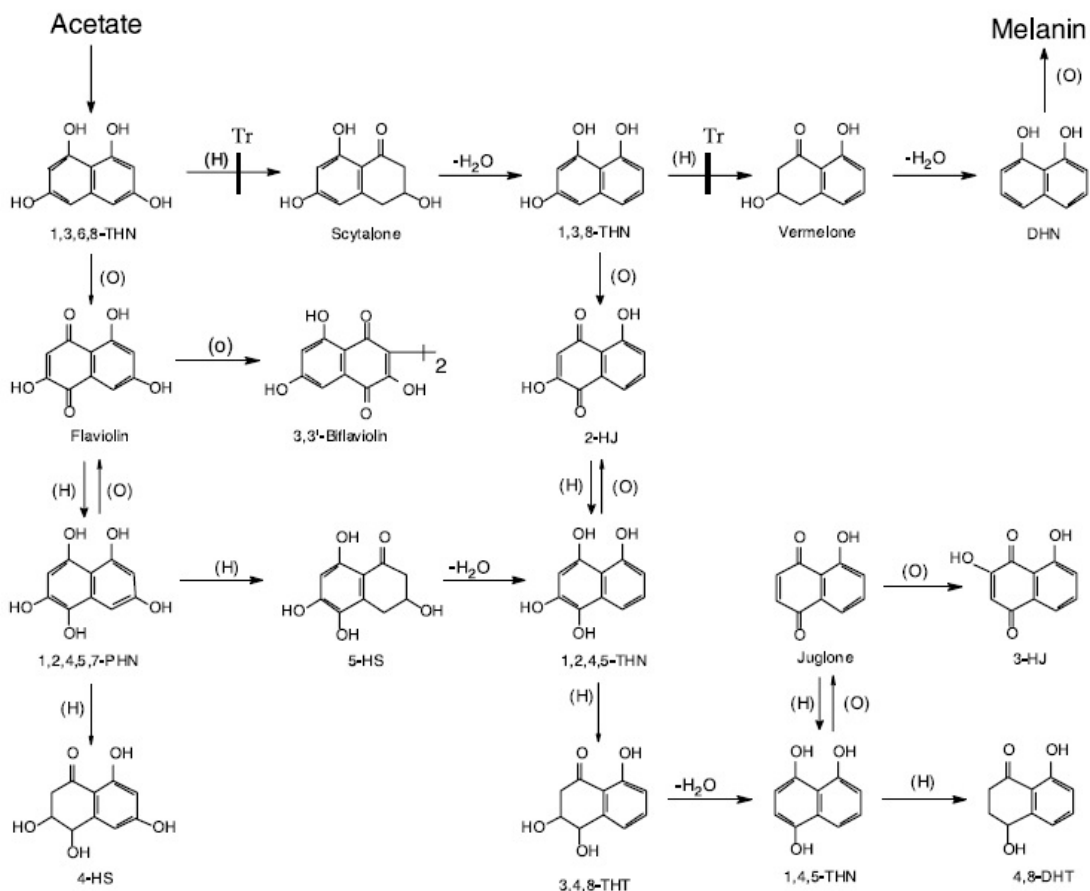


Figura 8. Via biossintética da melanina di-hidroxinaftaleno (DHN) e seus metabólitos. Triciclazol (Tr) inibe a redução de 1,3,6,8-THN e 1,3,8-THN para a scitalone e vermelona, respectivamente. Resultando na acumulação de scitalona, flaviolina, 3,3'-biflaviolina e 2-hidroxijuglona (2-HJ).

Fontes: Kogej et al., 2004 [208]; Wheeler et al., 2008 [210].



Figura 9. Crescimento de *Fonsecaea pedrosoi* em ágar batata dextrosado com e sem 16µg/mL de triciclazol (A e B, respectivamente) com 14 dias a 30°C.

Fonte: autoria própria

aflatoxina B1 por *Aspergillus* spp. [198,211]. Além disso, triciclazol é capaz de inibir crescimento de fungos fitopatogênicos, como por exemplo, é utilizado no combate a *Magnaporthe oryzae*, que causa brusone, levando a perda de 10-30% das plantações de arroz em vários países [212]. Entretanto, um estudo de 2006 [202] verificou que em presença de triciclazol na concentração de 16 µg/mL, não houve alteração na viabilidade de células de *F. pedrosoi* e portanto, este inibidor tem sido utilizado em experimentos com fungos pertencentes ao mesmo gênero [34,35]. Já alguns autores utilizaram outras formas de diminuir a produção de melanina, tais como crescimento do fungo em baixa aeração e luminosidade [40,213] e recentemente, foram utilizados mutantes albinos oriundos de dois anos de sub-cultivo de um isolado clínico displásico de *F. monophora* [35,36], no qual apresentava células negras, mas consideradas sub-hialinas após isolamento [89].

Em um destes estudos, Li e colaboradores [35] analisaram o transcriptoma destas cepas e identificaram a maioria dos genes que codificam as principais enzimas envolvidas nas vias de biossíntese da melanina, o que possibilitará avanços importantes no estudo de cada uma delas em diversas situações de exposição do fungo, como fatores extremos de origem ambiental e na interação com o hospedeiro. Ainda neste estudo, foi verificado que houve uma regulação negativa (*down regulation*) dos genes-chave na via DHN, enquanto que houve uma regulação positiva (*up regulation*) na via DOPA da cepa albina, indicando que as condições para desenvolvimento da cepa albina utilizadas no estudo levaram a uma diminuição da via DHN, mas influenciou o desenvolvimento da DOPA melanina para suprir a DHN melanina inibida, propiciando a produção de feomelanina e eumelanina (**Figura 10**). Os autores sugerem essa mesma abordagem em relação à utilização de triciclazol para inibição da via DHN, em que a melanina não é completamente inibida, pois as outras vias podem ser ativadas. No entanto, na indisponibilidade de mutantes naturais albinos, estudos que utilizam triciclazol como forma de inibição de DHN melanina para comparação de amostras com melanina inibida e não inibida em fungos são válidos, pois já foi citado que a utilização de triciclazol causaria o mesmo efeito que uma mutação em gene da redutase, inibindo a principal via de melanina e conseqüentemente, acarretando em diminuição da quantidade de melanina total [35,205].

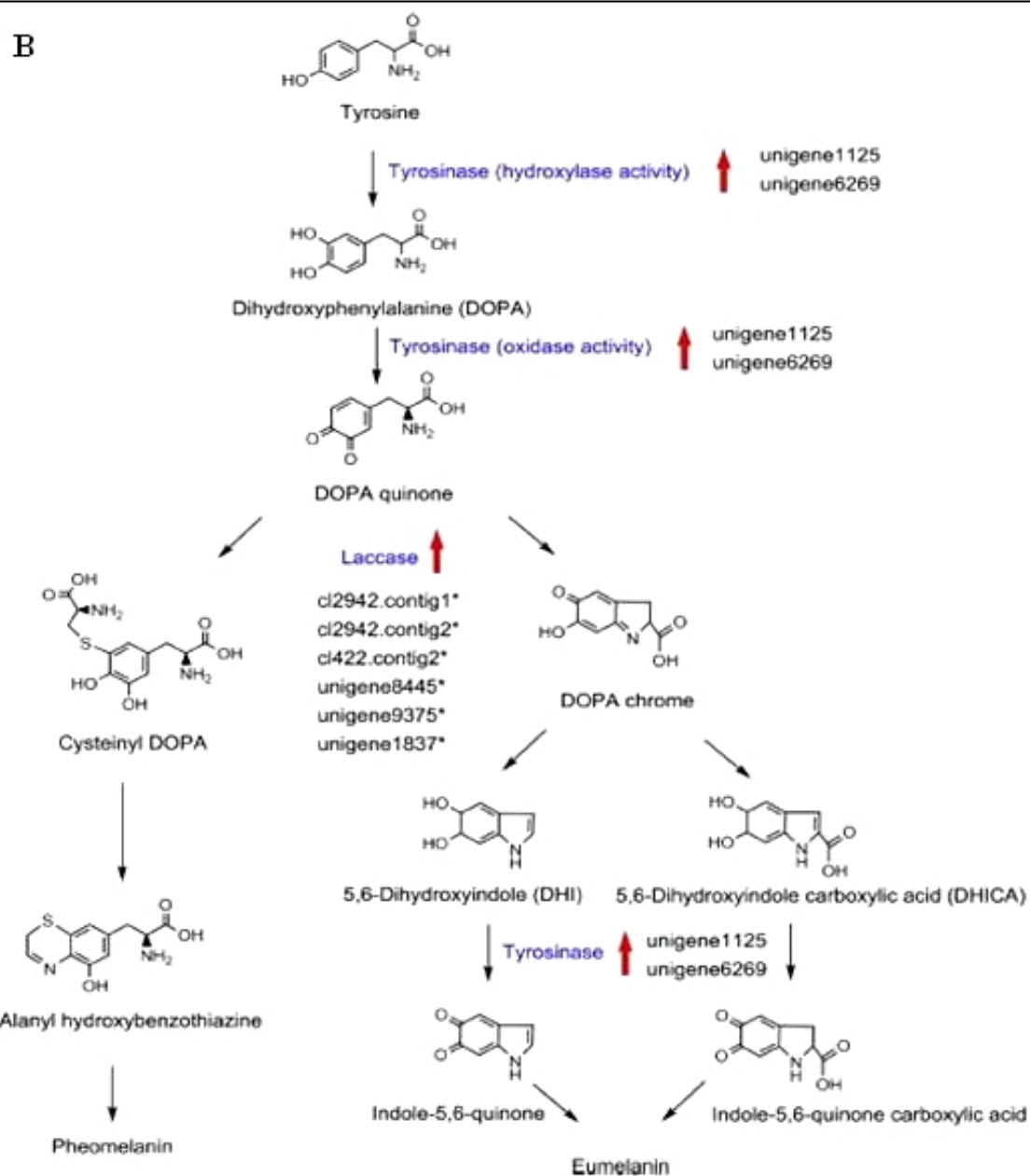
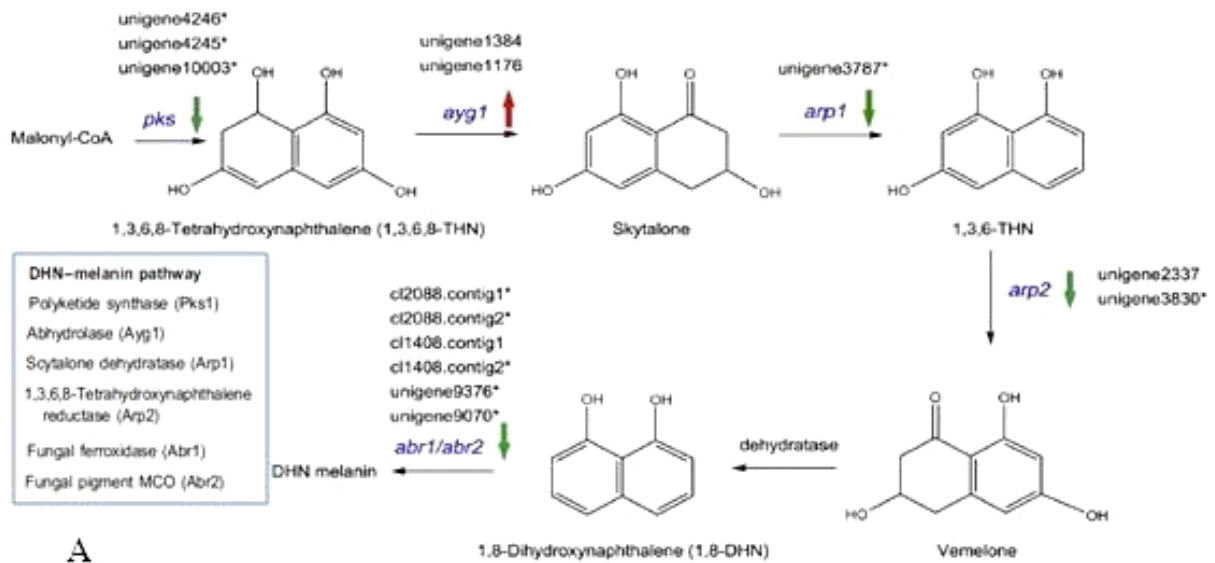


Figura 10. Via da DHN melanina (A), via DOPA melanina (B) e os níveis de transcrição de genes de enzimas envolvidas (azul). Seta de cor vermelha: regulação positiva; Seta de cor verde: regulação negativa; Estrela: expressão do gene significativamente diferente entre amostra albina e melanizada.

2.10.2 Caracterização de agentes da cromoblastomicose: análises qualitativas e quantitativas

Não há métodos para identificar as unidades monoméricas ou o polímero total de melanina devido às limitações dos parâmetros bioquímicos e biofísicos disponíveis [34]. Embora a estrutura da melanina seja desconhecida, há alguns métodos para análise qualitativa de melanina, como a avaliação de solubilização em solventes, ressonância eletrônica, espectroscopia no infravermelho, varredura na faixa do ultravioleta e visível e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo a última para identificação de alguns intermediários das vias sintéticas de melanina [31,196,210,214].

Devido a capacidade de solubilização das melaninas em base e precipitação em ácidos, as melaninas, como as de *Fonsecaea* spp., têm sido extraídas dos fungos com hidróxido de sódio e precipitadas com ácido clorídrico, através da chamada extração álcali-ácida, a qual é precedida das análises qualitativas e quantitativas das melaninas [34,40,209].

O estudo de Alviano et al. [40] caracterizou a melanina de *Fonsecaea* sp. e verificou que o pigmento negro encontrado neste fungo obteve resultados de solubilização similares aos encontrados nas melaninas estudadas por Ellis & Griffiths em 1974, sendo as mesmas insolúveis em água, ácidos e solventes como acetona, clorofórmio e etanol, mas solúveis em meio alcalino. A ressonância de *spin* eletrônico (*Electron spin resonance* – ESR) oferece características de um composto em relação à presença de elétrons desemparelhados [196,215], sendo que no espectro típico de melanina há um vale em 3.300 a 3.500 gauss, também já confirmado em amostra de *Fonsecaea* sp. [34,205,209,216] (**Figura 11A**).

A espectroscopia no infravermelho (IV) de melanina de *Fonsecaea* sp. foi avaliado por Alviano et al. [40], onde obtiveram bandas similares às de outros gêneros de fungos, que apresentam como bandas principais relacionadas à melanina: banda larga a 3360-3000 cm^{-1} , atribuída às vibrações de estiramento dos grupos OH; pico a 2920-2850 cm^{-1} , estiramento de NH; pico forte de absorção a 1633 cm^{-1} , vibrações dos grupos aromáticos (C=O ou C=C), na qual se acredita ser importante para identificação de melanina; pico a 1024 cm^{-1} , alongamento CH do anel aromático [39,209] (**Figura 11B**).

A espectroscopia de varredura no ultravioleta e visível (UV-VIS) não foi avaliado para agentes da CBM. Porém, para *Paecilomyces variotii* e *Aspergillus carbonarius*, fungos que apresentam DHN melanina, foi evidenciado que o último apresentou picos máximos de absorção em 280-310 nm e 420-450 nm, enquanto que o

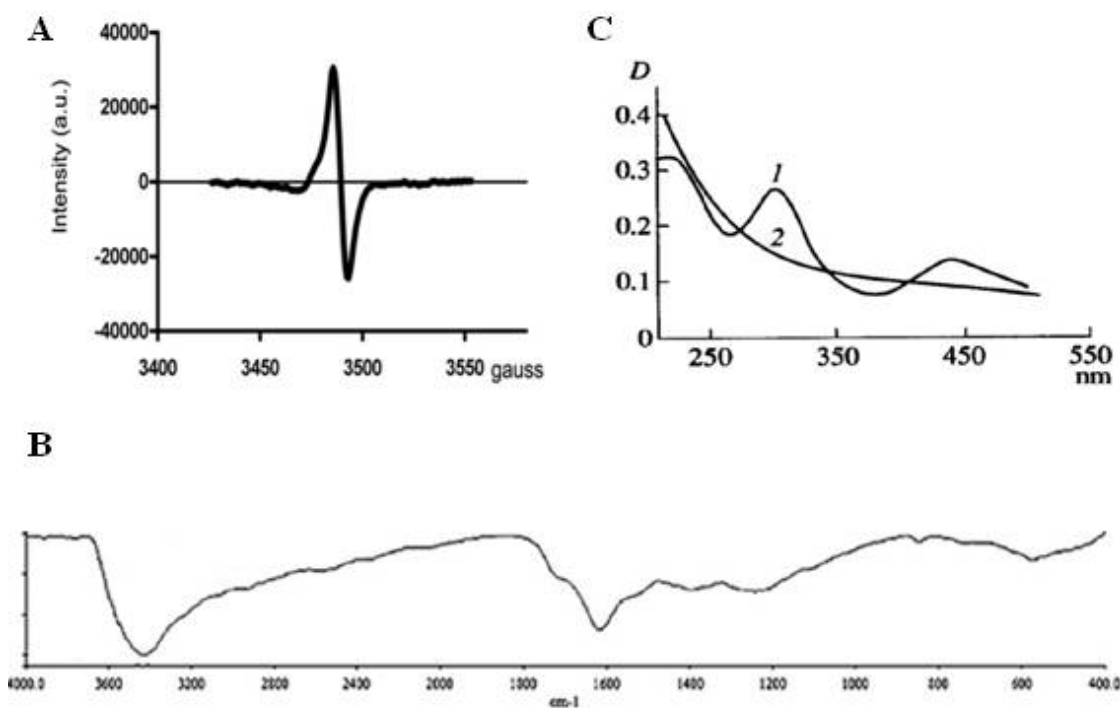


Figura 11. Espectros para avaliação qualitativa de melaninas. (A) Espectro de ressonância (ESR) de DHN melanina de *Fonsecaea* sp.; (B) Espectro de IV de DHN melanina de *Aspergillus tubingensis*; (C) Espectro de UV-VIS de DHN melanina de *Aspergillus carbonarius* (1) e *Paecilomyces variotii* (2).

Fontes: Cunha et al. [34]; Alviano et al. [40]; Babitskaya [39], respectivamente.

primeiro exibiu padrão de declínio [39] (**Figura 11C**).

Em relação a análises quantitativas de DHN melanina, como não há disponível este tipo de melanina sintética no mercado para utilização da mesma como padrão para quantificação, Pal et al. [209] utilizaram DOPA melanina sintética para obter curva padrão e realizaram leitura em 459nm para quantificação de DOPA e DHN melaninas de suas amostras de *Aspergillus* spp.. Porém, como são polímeros distintos, essa alternativa possivelmente leva a viés de aferição. Em outro estudo, Alviano et al. [40], relacionou massa de melanina extraída de determinada massa fúngica de *Fonsecaea* sp. usada para extração, obtendo relação de porcentagem de massas. Apesar dessa alternativa ser trabalhosa, devido à quantidade de fungo necessário para verificação da massa de melanina final, ela parece ser mais exata, pois evita comparação com padrão de outro

tipo de melanina. Neste último estudo, foi verificado que a massa de melanina correspondia a 2,7% da massa do fungo, enquanto que o mesmo isolado crescido em baixa aeração e luminosidade reduziu a produção de melanina, que foi representada como 0,2% da massa, o que sugere que análise gravimétrica é adequada para quantificação de DHN-melanina, pois o resultado pequeno esperado na condição de hipopigmentação foi alcançado.

2.10.3 Funções da melanina em agentes da cromoblastomicose

2.10.3.1 Função estrutural

Em estudo de Franzen et al. [202], foi verificado que uma amostra do fungo *F. pedrosoi* em contato com a concentração de 16 µg/mL de triciclazol, não apresentou significativas alterações na viabilidade celular, mas aumentou o tamanho celular e houve um espessamento da parede celular dos conídios na faixa de duas a três vezes em relação ao grupo não tratado. A presença de triciclazol no meio de cultura diminuiu a quantidade de grânulos elétrons densos na superfície celular - provavelmente melanina - de conídios e células escleróticas. Além disso, os autores citam a presença de invaginações na face interna na parede celular de células escleróticas. Estas alterações reforçam a ideia de que a melanina tem um papel na estruturação correta da parede fúngica e que a falta do pigmento diminui a robustez da parede celular, deixando o fungo mais suscetível à penetração de agentes danosos, como intermediários reativos do oxigênio e radiação.

2.10.3.2 Função antioxidante: proteção ambiental e escape do sistema imunológico

A melanina exibe ação antioxidante pronunciada, por interagir facilmente com os radicais livres e outras espécies reativas, devido à presença de elétrons desemparelhados em sua molécula. Em parte, por causa desta atividade antioxidante da melanina fúngica, este pigmento contribui para a sobrevivência dos fungos em ambiente hostil. Uma alta proporção de microrganismos produtores de melanina são conhecidos por estarem associados a áreas ambientalmente estressantes, como desertos quentes e frios, regiões alpinas e solo salino. Além disso, a melanina é conhecida por conferir proteção à irradiação UV, temperaturas extremas e à dessecação [208,217].

Em estudo recente, 2016, foram comparados mutantes albinos e melanizados de *F. monophora* por análise transcriptômica, identificou uma regulação negativa (*down regulation*) dos mutantes albinos nos genes das enzimas envolvidas com proteção contra danos causados por oxidantes e UV (superóxido dismutase e deoxiribodipirimidina fotoliase, respectivamente) [35]. Corroborando com o estudo genotípico realizado neste trabalho, o resultado fenotípico, *in vitro*, foi avaliado com quatro isolados da mesma espécie do estudo anterior e verificou que os dois mutantes albinos foram significativamente mais sensíveis do que os dois isolados melanizados quando expostos ao pH extremamente ácido e alcalino (pH<2 e >10, respectivamente), à radiação UV contínua de até três semanas de exposição, e ao teste de estresse oxidativo utilizando doador de NO (*S-nitroso-N-acetylpenicillamine*) [36], indicando que a melanina de *F. monophora* tem importante papel na defesa contra esses agentes agressivos.

A taxa de sobrevivência dos fungos negros foi avaliada após liberação de espécies reativas do oxigênio (*burst* oxidativo) por neutrófilos. Os resultados sugerem que baixas taxas de morte podem indicar ou mesmo prever um alto grau de invasividade do fungo, indicando que a resistência do fungo contra agentes reativos do oxigênio liberados por neutrófilos tem relação com a invasividade do fungo. Além disso, observaram que isolado albino de *Exophiala dermatitidis* sobreviveu menos após o processamento pelo neutrófilo do que a cepa não albina [218], indicando, portanto, que a presença de melanina protegeu o fungo do ataque oxidante dos neutrófilos, o que aumenta a invasividade dos fungos negros pelo escape do sistema imunológico.

Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos ao analisar *Fonsecaea* sp. e sua interação com células do sistema imune *in vitro*. Observaram que englobamento por macrófagos ativado retarda a germinação e desenvolvimento de hifas, mas que neutrófilos e macrófagos não são capazes de combater fungos dematiáceos, por meio de oxidação, devido à presença da melanina [38]. Já foi visto que melanina extraída de *F. pedrosoi* [219] e a amostra pigmentada [220] inibiram a produção de NO por macrófagos *in vitro*. Já quando a melanina apresentava-se inibida, os macrófagos fagocitaram um maior número de conídios [37] e aumentaram a liberação de agentes reativos do oxigênio [34]. Também houve menor resistência ao NO pelos mesmos [34], propiciando dessa forma, maior facilidade do sistema imunológico na eliminação de células com melanina inibida.

Apesar do caráter antioxidante da melanina, que protege contra a destruição por fagócitos, resultados discordantes foram obtidos. Um estudo verificou que a interação

de *F. pedrosoi* com fagócitos, na presença de melanina exógena adicionada nos testes, resultou em um maior nível de internalização de fungos e de destruição pelas células do hospedeiro, que foi acompanhado por maiores graus de liberação de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos e macrófagos *in vitro* [221]. Outro estudo observou que há uma maior ativação das proteínas do complemento, principalmente da via alternativa, em micélio de *F. pedrosoi* pigmentado quando comparado com hipopigmentado, sugerindo que a melanina serve como acceptor dessas proteínas na parede celular [213] e facilitaria o ataque e eliminação destas células pelo sistema imune. De qualquer forma, todos os estudos citados anteriormente mostram que a melanina deste fungo é um componente imunologicamente ativo, que atua ativando resposta imune humoral e celular do hospedeiro.

Em relação a testes utilizando H_2O_2 *in vitro* existem resultados discordantes. Um estudo mostrou que na concentração de 15mM, o crescimento dos isolados diminuiu 80% em relação ao controle, tanto das amostras albinos quanto das melanizadas, não apresentando diferenças que poderiam sugerir uma proteção da melanina frente ao H_2O_2 [36]. No entanto, somente quatro isolados de *F. monophora* foram analisados neste experimento e não foi citado como foram preparadas as amostras para a inoculação nas placas com diferentes concentrações de H_2O_2 , sendo necessária a padronização das mesmas para obter resultados confiáveis para comparação entre as amostras. Já no estudo de Cunha e colaboradores [34], foi verificado que concentração de 5 mM, o H_2O_2 reduziu o desenvolvimento das amostras, sendo estatisticamente mais suscetível quando a amostra cresceu com 16 $\mu\text{g/mL}$ de triciclazol em comparação com a mesma amostra com melanina não inibida. Porém, esse estudo avaliou somente uma amostra de *F. pedrosoi*, sendo necessário um maior número de isolados para confirmação da hipótese.

2.10.4 Melanina: relação com antifúngicos

A melanina se liga quimicamente a diversos compostos, incluindo medicamentos, como gentamicina, metotrexato e clorpromazina [31]. Com antifúngicos, há estudos que evidenciaram ligação da AMB e da caspofungina à DOPA melanina extraída de *Cryptococcus neoformans* ou obtida por síntese. Os experimentos levaram em consideração as CIMs [41,42] e razão de C:N:O [42] obtidas dos antifúngicos que entraram em contato prévio com a melanina antes destas análises. Assim, as CIMs

foram maiores quando os antifúngicos obtiveram contato com melanina, mostrando que houve ligação de AMB e caspofungina com melanina, impedindo a ligação dos antifúngicos nos sítios alvo dos fungos através de impedimento estérico e alterando a molécula do antifúngico. Já para o ITZ, FCZ, VRZ e 5-flucitosina, não houve alteração quando foram expostos à melanina [41,42,222].

Um estudo com oito amostras de *Madurella mycetomatis*, um produtor de DHN melanina, mostrou que este tipo de melanina também apresentou efeito protetor a antifúngicos. Quando a melanina foi adicionada no meio de cultura, as CIMs obtidas foram 16 vezes maior para o ITZ e 32 vezes maior para o KTZ [43]. Entretanto, comparando dois isolados melanizados e dois albinos de *F. monophora*, não houve diferenças significativas em relação à suscetibilidade dessas amostras frente a oito antifúngicos (ITZ, FCZ, VRZ, PSZ, isavuconazol, AMB, caspofungina e anidulafungina) [36], resultado este que pode ser reflexo do baixo número de isolados de *F. monophora* que foi avaliado.

3 JUSTIFICATIVA

Este trabalho se justifica pelo fato de poucos estudos disponíveis na literatura avaliarem a importância da melanina em agentes da CBM, sendo que estes estudos são utilizados baixo número de isolados de um dos gêneros de CBM, *Fonsecaea*. Dessa forma, não há estudos na literatura comparando as espécies identificadas molecularmente que compõe os agentes da CBM em relação a diferenças na quantificação de melanina e na influência da mesma frente ao estresse oxidativo e relação com antifúngicos. Além disso, inserir os agentes da CBM em uma ferramenta de identificação de microrganismos é importante para gerar maior robustez na metodologia, impulsionando a tecnologia para utilização em laboratório clínico de identificação microbiológica.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo primário

Avaliar a influência da melanina nas diferentes espécies de agentes da CBM identificados por análise do DNA e propor identificação desses agentes por FTIR.

4.2 Objetivos secundários

- a. Propor utilização de FTIR para identificação de agentes da CBM utilizando identificação a partir do sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal como método padrão;
- b. Avaliar a proteção da melanina contra os efeitos oxidativos do H₂O₂ em agentes de CBM tratados ou não tratados com inibidor de melanina, triciclazol;
- c. Comparar a quantificação de melanina extraível com NaOH de cinco gêneros de agentes de CBM e confirmar a extração de melanina por meio da avaliação do espectro de varredura ultravioleta e visível (UV-VIS);
- d. Avaliar a influência da melanina de agentes da CBM na resposta aos antifúngicos através da comparação pareada dos isolados submetidos ou não a inibição *in vitro* da biossíntese de melanina;
- e. Comparar a suscetibilidade das espécies de agentes da CBM a seis antifúngicos utilizados na clínica.

5 REFERÊNCIAS

1. Queiroz-Telles F, de Hoog S, Santos DW, Salgado CG, Vicente VA, Bonifaz A, et al. Chromoblastomycosis. *Clin Microbiol Rev* 2017; 30(1): 233-76.
2. Rojas OC, González GM, Moreno-Treviño M, Salas-Alanis J. Chromoblastomycosis by *Cladophialophora carrionii* associated with squamous cell carcinoma and review of published reports. *Mycopathologia* 2015; 179: 153-7.
3. Paul C, Dupont B, Pialoux G, Avril MF, Pradinaud R. Chromoblastomycosis with malignant transformation and cutaneous-synovial secondary localization. The potential therapeutic role of itraconazole. *J Med Vet Mycol* 1991; 29: 313-6.
4. Esterre P, Pecarrère JL, Raharisolo C, Huerre M. Squamous cell carcinoma arising from chromomycosis. Report of two cases. *Ann Pathol* 1999; 19: 516-20.
5. Jamil A, Lee YY, Thevarajah S. Invasive squamous cell carcinoma arising from chromoblastomycosis. *Med Mycol* 2012; 50: 99-102.
6. Azevedo MPS, Marques SM, Santos DW, Silva RR, Silva NF, Santos DA, Resende-Stoianoff MA. Squamous cell carcinoma derived from chronic chromoblastomycosis in Brazil. *Clin Infect Dis* 2015; 60: 1500-4.
7. Minotto R, Bernardi CDV, Mallmann LF, Edelweiss IA, Scroferneker ML. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: 585-92.
8. Wackym PA, Gray Jr GF, Richie RE, Gregg CR. Cutaneous chromomycosis in renal transplant recipients. Successful management in two cases. *Arch Intern Med* 1985; 145: 1036-7.
9. Rippon JW. *Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic Actinomycetes*. 3th edition. Philadelphia: W.B. Saunders; 1988.
10. Milam CP, Fenske NA. Chromoblastomycosis. *Dermatol Clin* 1989; 7(2): 219-25.
11. Matte SMW. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. *Revista*

Soc Bras Med Trop 1997; 30(4): 309-11.

12. Queiroz-Telles F, Esterre P, Perez-Blanco M, Vitale RG, Salgado CG, Bonifaz A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol* 2009; 47(1): 3-15.

13. Torres-Guerrero E, Isa-Isa R, Isa M, Arenas R. Chromoblastomycosis. *Clinics in Dermat* 2012; 30: 403–8.

14. Zhu CY, Yang YP, Sheng P, Li W, Huang WM, Fan YM. Cutaneous chromoblastomycosis caused by *Veronaea botryosa* in a Patient with *Pamphigus Vulgaris* and review of published Reports. *Mycopathologia* 2015; 180(1-2): 123-9.

15. Gomes RR, Vicente VA, Azevedo CM, Salgado CG, da Silva MB, Queiroz-Telles F, et al. Molecular epidemiology of agents of human chromoblastomycosis in Brazil with the description of two novel species. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(11): e0005102.

16. Sun J, Najafzadeh MJ, Gerrits van den Ende AH, Vicente VA, Feng P, Xi L, de Hoog GS. Molecular characterization of pathogenic members of the genus *Fonsecaea* using multilocus analysis. *PLoS One* 2012; 7: e41512.

17. Naumann, D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* R.A. Meyers (Ed.) John Wiley & Sons Ltd. Chichester, United Kingdom 2000; 102-31.

18. Schmalreck AF, Tränkle P, Vanca E, Blaschke-Hellmessen R. Differentiation and characterization of yeasts pathogenic for humans (*Candida albicans*, *Exophiala dermatitidis*) and algae pathogenic for animals (*Prototheca* spp.) using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in comparison with conventional methods. *Mycoses* 1998; 41(S1): 71-7.

19. Bonifaz A, Carrasco-Gerard E, Saul A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses* 2001; 44: 1–7. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00613.x>.

20. Queiroz-Telles F, Santos DW. Challenges in the therapy of chromoblastomycosis. *Mycopathologia* 2013; 175: 477– 488. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11046->

013-9648-x.

21. Queiroz-Telles F, Purim KS, Fillus JN, Bordignon GF, Lameira RP, Van Cutsem J, et al. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. *Int J Dermatol* 1992; 31: 805–812.
22. Restrepo A, Gonzalez A, Gomez I, Arango M, de Bedout C. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 544: 504 –516. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb40448.x>.
23. Tanuma H, Hiramatsu M, Mukai H, Abe M, Kume H, Nishiyama S, et al. Case report. A case of chromoblastomycosis effectively treated with terbinafine. Characteristics of chromoblastomycosis in the Kitasato region, Japan. *Mycoses* 2000; 43:79 – 83. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2000.00548.x>.
24. Esterre P, Inzan CK, Ramarcel A, Andriantsimahavandy M, Ratsioharana M, Pecarrere JL, et al. Treatment of chromomycosis with terbinafine: preliminary results of an open pilot study. *Br J Dermatol* 1996; 134 (Suppl 46): 33–36. Available from: doi: 10.1111/j.1365-2133.1996.tb15658.x.
25. Bonifaz A, Saúl A, Paredes-Solis V, Araiza J, Fierro-Arias L. Treatment of chromoblastomycosis with terbinafine: experience with four cases. *J Dermatol Treat* 2005; 16:47–51. Available from: <https://doi.org/10.1080/09546630410024538>.
26. Najafzadeh MJ, Badali H, Illnait-Zaragozi MT, de Hoog GS, Meis JF. *In vitro* activities of eight antifungal drugs against 55 clinical isolates of *Fonsecaea* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:1636–38. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.01655-09>.
27. Badali H, Fernández González M, Mousavi B, Illnait-Zaragozi MT, González Rodríguez JC, de Hoog GS. Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* and *F. monophora* in Cuba. *Mycopathologia* 2013; 175:439-44.
28. Yu J, Li R, Zhang M, Liu L, Wan Z. *In vitro* interaction of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblastomycosis in China. *Med Mycol* 2008; 46:745–47.

29. Yang YP, Li W, Huang WM, Zhou Y, Fan YM. Chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea*: clinicopathology, susceptibility and molecular identification of seven consecutive cases in Southern China. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19(11):1023-8. Available from: doi: 10.1111/1469-0691.12067.
30. Fothergill AW, Rinaldi MG, Sutton DA. Antifungal susceptibility testing of *Exophiala* spp.: a head-to-head comparison of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *Med Mycol* 2009; 47: 41- 3.
31. Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* 2003; 5(4): 203-23.
32. Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres- Guerrero H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun* 2000; 68: 3696-703. doi: 9-9567/00/\$04.0010.
33. Franzen AJ, Cunha MML, Batista EJO, Seabra SH, de Souza W, Rozental S. Effects of Tricyclazole (5-methyl-1,2,4-triazol[3,4]benzothiazole), a Specific DHN–Melanin Inhibitor, on the Morphology of *Fonsecaea pedrosoi* Conidia and Sclerotic Cells *Microsc Res Tech*. 2006; 69: 729-37.
34. Cunha MM, Franzen AJ, Seabra SH, Herbst MH, Vugman NV, Borba LP, et al. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiol* 2010; 10: 80. Available from: doi: 10.1186/1471-2180-10-80.
35. Li XQ, Guo BL, Cai WY, Zhang JM, Huang HQ, Zhan P, et al. The role of melanin pathways in extremotolerance and virulence of *Fonsecaea* revealed by de novo assembly transcriptomics using illumina paired-end sequencing. *Studies in mycology* 2016; 83: 1–18. Available from: doi: 10.1016/j.simyco.2016.02.001.
36. Sun J, Zhang J, Najafzadeh MJ, Badali H, Li X, Xi L, et al. Melanization of a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora* increases tolerance to stress factors while no effects on antifungal susceptibility. *Mycopathologia* 2011; 172(5): 373-80. Available from: doi: 10.1007/s11046-011-9439-1.
37. Farbiarz SR, de Carvalho TU, Alviano C, de Souza W. Inhibitory effect of melanin

on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells in vitro. J Med Vet Mycol 1992; 30(4): 265-73.

38. Rozental S, Alviano CS, de Souza W. The *in vitro* susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. Mycopathologia. 1994; 126: 85-91. Available from: doi:10.1007/BF01146200.

39. Babitskaia VG, Shcherba VV, Filimonova TV, Grigorchuk EZ. Melanin pigments of the fungi *Paecilomyces variotii* and *Aspergillus carbonarius*. Appl Bioch Microbiol. 2000; 36(2): 128-33.

40. Alviano CS, Farbiarz SR, De Souza W, Angluster J, Travassos LR. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. J Gen Microbiol 1991; 137(4): 837-44. Available from: doi: 10.1099/00221287-137-4-837.

41. Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. Microbiol Immunol 2003; 47:271–77.

42. van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(11): 3394–00.

43. van de Sande WW, de Kat J, Coppens J, Ahmed AO, Fahal A, Verbrugh H, et al. Melanin biosynthesis in *Madurella mycetomatis* and its effect on susceptibility to itraconazole and ketoconazole. Microb Infect 2007; 9: 1114-23. Available from: doi: 10.1016/j.micinf.2007.05.015.

44. Queiroz-Telles F, Nucci M, Colombo AL, Tobón A, Restrepo A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. Med Mycol 2011; 49: 225–36. Available from: <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.539631>.

45. Reiss H, Shadomy HJ, Lyon GM, III. Sporotrichosis. In: Fundamental Medical Mycology. Hoboken, NJ: WileyBlackwell; 2012; 215-32.

46. World Health Organization, Savioli L, Daumerie D, World Health Organization. Department of Control of Neglected Tropical Diseases, and ProQuest (Firm). Sustaining

the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 2013.

47. Van de Sande WWJ, Maghoub ES, Fahal AH, Goodfellow M, Welsh O, Zijlstra E. The Mycetoma Knowledge Gap: Identification of Research Priorities. Wanke B, ed. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8(3): e2667. Available from: doi:10.1371/journal.pntd.0002667.

48. Brygoo ER. La chromoblastomycose à Madagascar. *Sem Hop Paris* 1957; 33: 774-89.

49. Brygoo ER, Segretain G. Étude clinique épidémiologique et mycologique de la chromoblastomycose à Madagascar. *Bull Soc Pathol Exot* 1960; 53: 443– 47.

50. Rudolph M. Über die brasilianische “Figueira” (Vorläufige Mitteilung). *Arch Schiffs Trop Hyg* 1914; 18: 498–99.

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

52. Lane CG. A cutaneous disease caused by a new fungus *Phialophora verrucosa*. *J Cutan Dis* 1915; 33: 840–46.

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

54. Brumpt E. *Precis de parasitologie*, 3rd ed. Masson et Cie, Paris, France. 1922; 1105.

55. Negroni P. Estudio del primer caso argentino de cromomicosis, *Fonsecaea* (Neg.) *pedrosoi* (Brump) 1921. *Dept Nat de Higiene Rev Inst Bacteriol* 1936; 7: 419–26.

56. Terra F, Torres M, Fonseca Filho O, Arêa Leão AE. Novo tipo de dermatite verrucosa; micose por *Acrotheca* com associação de leishmaniose. *Bras Med* 1922; 36:363–68.

57. Moore M, Almeida F. Etiologic agents of chromomycosis (chromoblastomycosis) of

Terra, Torres, Fonseca and Leão, 1922) of North and South America. *Rev Biol Hyg* 1935; 6: 94-7.

58. Ajello L, Georg LK, Steilbige RT, Wang K. A case of phaeohyphomycosis caused by a new species of *Phialophora*. *Mycologia* 1974; 66: 490–98. Available from: <https://doi.org/10.2307/3758492>.

59. Kampirapap K, Reangchainam S, Ornpaew P, Tresukosol P. Chromoblastomycosis masquerading as dermatophytosis, with the description of a new opportunistic species. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2015; 46:105–109.

60. de Hoog GS, Vicente VA, Najafzadeh MJ. Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. *Persoonia* 2011; 27: 46–72. Available from: doi: 10.3767/003158511X614258.

61. Feng P, Lu Q, Najafzadeh MJ, Gerrits van den Ende AHG, Sun J, Li R, et al. *Cyphellophora* and its relatives in *Phialophora*: biodiversity and possible role in human infection. *Fungal Divers* 2012; 65: 17–45. Available from: doi:10.1007/s13225-012-0194-5.

62. Vicente VA, Najafzadeh MJ, Sun J, Gomes RR, Robl D, Marques SG, et al. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. *Fungal Divers* 2013; 62: 1–17.

63. de Hoog, GS Weenink, XO van den Ende, AHGG. Taxonomy of the *Phialophora verrucosa* complex with the description of two new species. *Stud Mycol* 1999; 43: 107-22.

64. Verma P, Karmakar S, Pandhi D, Singal A, Yadav P, Khare S. Chromoblastomycosis caused by *Cladophyalophora bantiana* in a renal transplant recipient from Delhi, India. *Skinmed* 2015; 13: 251–54.

65. Brischetto A, Kidd S, Baird R. First reported Australian case of *Cladophialophora arxii*: features consistent with possible primary pulmonary chromoblastomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2015; 92: 791–93. Available from: doi: 10.4269/ajtmh.14-0711.

66. Howard SJ, Walker SL, Andrew SM, Borman AM, Johnson EM, Denning DW.

Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladophialophora devriesii* in a United Kingdom resident. *Med. Mycol* 2006; 44: 553–56. Available from: doi: 10.1080/13693780600575627.

67. Pereira RR, Nayak CS, Deshpande SD, Bhatt KD, Khatu SS, Dhurat RS. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladophialophora boppii*. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2010; 76: 695–8. Available from: doi: 10.4103/0378-6323.72474.

68. NCBI. Nucleotide: *Fonsecaea minima*. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=fonsecaea+minima>>. [Accessed April 5th 2017].

69. NCBI. Nucleotide: *Fonsecaea minima*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NW_017387300.1> [Accessed April 5th 2017].

70. Silva JP, de Souza W, Rozental S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic region (Brazil). *Mycopathologia* 1998; 143:171–75. Available from: <https://doi.org/10.1023/A:1006957415346>.

71. Pires CAA, Simões JA, Xavier MB, Quaresma BR, Macedo GMM, Souza BRM, et al. Clinical, epidemiological and mycological report on 65 patients from the Eastern Amazon region with chromoblastomycosis. *An Bras Dermatol* 2012; 87: 555–60. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962012000400006>.

72. Shankar J, Restrepo A, Clemons KV, Stevens DA. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 296 –313. Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR.00062-10>.

73. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 1984; 46: 346 –53.

74. Al-Doory Y. Chromomycosis. In: Di Salvo AF. Occupational mycoses. Philadelphia: Lea & Febiger 1983; 95-121.

75. Silva CM, da Rocha RM, Moreno JS, Silva RR, Marques SG, Costa JM. The coconut babaçu (*Orbignya phalerata* martins) as a probable risk of human infection by the agent of chromoblastomycosis in the State of Maranhão, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1995; 28: 49 –52. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0037-86821995000100009>.
76. Menezes N, Varela P, Furtado A, Couceiro A, Calheiros I, Rosado L, et. al. Chromoblastomycosis associated with *Fonsecaea pedrosoi* in a carpenter handling exotic woods. *Dermatol Online J* 2008; 14: 9.
77. Esterre P, Andriantsimahavandy A, Raharisolo C. Natural history of chromoblastomycosis in Madagascar and the Indian Ocean. *Bull Soc Pathol Exot* 1997; 90: 312–17.
78. Lu S, Lu C, Zhang J, Hu Y, Li X, Xi L. Chromoblastomycosis in mainland China: a systematic review on clinical characteristics. *Mycopathologia* 2013; 175: 489–95. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11046-012-9586-z>.
79. Vicente AP, Attili DA, Queiroz-Telles F, Pizzirani-Kleiner AP. Isolation of herpotrichiellaceous fungi from the environment. *Braz J Microbiol* 2001; 32: 47–51. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000100011>.
80. Salgado CG, da Silva JP, Diniz JAP, da Silva MB, Costa PF, Teixeira C, et. al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2004; 46: 33–6.
81. Marques SG, Silva SMP, Saldanha PC, Rezende PC, Vicente MA, Queiroz-Telles F, et. al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhao, Brazil. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2006; 47: 305–11. Available from: <https://doi.org/10.3314/jjmm.47.305>.
82. Mello e Silva ACC, Serra Neto A, Galvão CES, Marques SG, Saldanha ACR, Pedroso e Silva CDM, et. al. *Fonsecaea pedrosoi*-caused chromoblastomycosis in the state of Maranhão. The clinical, epidemiological and evolutionary aspects. *Rev Soc Bras Med Trop* 1992; 25: 37–44. Available from: [10.1590/S0037-86821992000100006](https://doi.org/10.1590/S0037-86821992000100006).

83. Miller EA, Montali RJ, Ramsay EC, Rideout BA. Disseminated chromoblastomycosis in a colony of ornate-horned frogs (*Ceratophrys ornata*). *J Zoo Wildl Med* 1992; 23:433–38.
84. Bube A, Burkhardt E, Weilb R. Spontaneous chromomycosis in the marine toad (*Bufo marinus*). *J Comp Pathol* 1992; 106: 73-7. Available from: [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(92\)90069-7](https://doi.org/10.1016/0021-9975(92)90069-7).
85. Najafzadeh MJ, Vicente VA, Sun J, Meis JF, de Hoog GS. *Fonsecaea multimorphosa* sp. nov, a new species of Chaetothyriales isolated from a feline cerebral abscess. *Fungal Biol* 2011; 115: 1066 –76. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.06.007>.
86. Vicente VA, Oréelis-Ribeiro R, Najafzadeh MJ, Sun J, Guerra RS, Miesch S, et. al. Black yeast-like fungi associated with lethargic crab disease (LCD) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). *Vet Microbiol* 2012; 158: 109–122. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.01.031>.
87. Esterre P, Andriantsimahavandy A, Ramarcel ER, Pecarrere JL. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 45– 7.
88. Álvarez-Montiel I, Bonifaz AA. Cromoblastomycosis en placa superficial. Manifestación de una variante poco habitual. *Dermatol Rev Mex* 2014; 58: 529 –33.
89. Xi L, Sun J, Lu C, Liu H, Xie Z, Fukushima K, et. al. Molecular diversity of *Fonsecaea* (Chaetothyriales) causing chromoblastomycosis in Southern China. *Med Mycol*. 2009; 47: 27–33. Available from: <https://doi.org/10.1080/13693780802468209>.
90. La Hoz RM, Baddley JW. Subcutaneous fungal infections. *Curr Infect Dis Rep* 2012; 14(5): 530-9. Available from: doi: 10.1007/s11908-012-0275-3.
91. Takase T, Baba T, Uyeno K. Chromomycosis. A case with widespread rash, lymph node metastasis and multiple subcutaneous nodules. *Mycoses* 1988; 31: 343–52.
92. Ogawa MM, Alchorne MM, Barbieri A, Castiglioni ML, Penna AP, Tominoro-Yamashita J. Lymphoscintigraphic analysis in chromoblastomycosis. *Int J Dermatol* 2003; 42: 622– 25. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.2003.01814.x>.

93. Queiroz-Telles F, Santos DWC, Pedroso C. Fungal infections of implantation (chromoblastomycosis, mycetoma, entomophthoromycosis and lacaziosis). In Hospenthal D, Rinaldi MG (ed), *Diagnosis and treatment of fungal infections*, 2nd ed. Springer International Publishing, Basel, Switzerland; 2015; 271–76.
94. McGinnis MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. *J Am Acad Dermatol* 1983; 8: 1–16. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(83\)70001-0](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(83)70001-0).
95. Queiroz-Telles F, Santos DWCL. Chromoblastomycosis in the clinical practice. *Curr Fungal Infect Rep* 2012; 6:312–19. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12281-012-0116-8>.
96. de Azevedo CMPS, Gomes RR, Vicente VA, Santos DWCL, Marques SG, Nascimento MMF, et. al. *Fonsecaea pugnacius*, a novel agent of disseminated chromoblastomycosis. *J Clin Microbiol* 2015; 53:2674 –2685. Available from: <https://doi.org/10.1128/JCM.00637-15>.
97. Camara-Lemarroy CR, Soto-Garcia AJ, Preciado-Yopez CI, Moreno-Hoyos F, Hernandez-Rodriguez PA, Galarza-Delgado DA. 2013. Case of chromoblastomycosis with pulmonary involvement. *J Dermatol* 40:746–748. Available from: <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12216>.
98. Carrión AL. Chromoblastomycosis. *Ann N Y Acad Sci* 1950; 50: 1255–82. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1950.tb39826.x>.
99. Bayles MA. Chromomycosis. In Hay RJ (ed), *Bailliere's clinical tropical medicine and communicable diseases. Tropical fungal infections*. WB Saunders: London, United Kingdom. 1986; 45–70.
100. Rippon JW. *Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*, 2nd ed. WB Saunders: Philadelphia, PA. 1982; 249–76.
101. Borelli D. A clinical trial of itraconazole in the treatment of deep mycoses and leishmaniasis. *Rev Infect Dis* 1987; 9(S1): S57–S63. Available from: https://doi.org/10.1093/clinids/9.Supplement_1.S57.

102. McGinnis MR, Pasarell L.. *In vitro* evaluation of terbinafine and itraconazole against dematiaceous fungi. *Med Mycol* 1998; 36: 243–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/02681219880000371>.
103. McGinnis MR, Pasarell L. *In vitro* testing of susceptibilities of filamentous ascomycetes to voriconazole, itraconazole, and amphotericin B, with consideration of phylogenetic implications. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2353-5.
104. Daboit TC, Magagnin CM, Heidrich D, Castrillón MR, Mendes SD, Vettorato G, et al. A case of relapsed chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora*: antifungal susceptibility and phylogenetic analysis. *Mycopathologia* 2013; 176(1-2): 139-44. Available from: doi: 10.1007/s11046-013-9660-1.
105. Najafzadeh MJ, Gueidan C, Badali H, van den Ende AH, Xi L, de Hoog GS. Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. *Med Mycol* 2009; 47: 17–25. Available from: <https://doi.org/10.1080/13693780802527178>.
106. Grant SM, Clissold SP. Itraconazole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in superficial and systemic mycoses. *Drugs* 1989; 37: 310–44.
107. Kuttner BJ, Siegle RJ. Treatment of chromomycosis with a CO₂ laser. *J Dermatol Surg Oncol*. 1986; 12: 965-8.
108. Corbellini VA. Síntese e avaliação de propriedades fotofísicas e biológicas de 2-(2'-hidroxifenil) benzoxazolas e cumarinas em fungos de interesse clínico. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2004.
109. Ranawaka RR, Amarasinghe N, Hewage D. Chromoblastomycosis: combined treatment with pulsed itraconazole therapy and liquid nitrogen cryotherapy. *Int J Dermatol* 2009; 48(4): 397-400. Available from: doi: 10.1111/j.1365-4632.2009.03744.x
110. Bonifaz A, Martínez-Soto E, Carrasco-Gerard E, Peniche J. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery, and a combination of both. *Int J Dermatol* 1997; 36(7): 542-7.

111. Bassas-Vila J, Fuente MJ, Guinovart R, Ferrándiz C. Chromoblastomycosis: response to combination therapy with cryotherapy and terbinafine. *Actas Dermosifiliogr* 2014; 105(2): 196-8. Available from: doi: 10.1016/j.ad.2013.02.008.
112. Lyon JP, Pedroso e Silva Azevedo Cde M, Moreira LM, de Lima CJ, de Resende MA. Photodynamic antifungal therapy against chromoblastomycosis. *Mycopathologia* 2011; 172(4): 293-7. Available from: doi: 10.1007/s11046-011-9434-6.
113. Yang Y, Hu Y, Zhang J, Li X, Lu C, Liang Y, et al. Refractory case of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora* with improvement by photodynamic therapy. *Med Mycol* 2012; 50(6): 649-53. Available from: doi: 10.3109/13693786.2012.655258.
114. Hu Y, Huang X, Lu S, Hamblin MR, Mylonakis E, Zhang J, et al. Photodynamic therapy combined with terbinafine against chromoblastomycosis and the effect of PDT on *Fonsecaea monophora in vitro*. *Mycopathologia* 2015; 179(1-2): 103-9. Available from: doi: 10.1007/s11046-014-9828-3.
115. Revankar SG, Sutton DA. Melanized fungi in human disease *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(4): 884-928. Available from: doi: 10.1128/CMR.00019-10.
116. National Committee of Clinical and Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility of conidium-forming filamentous fungi; proposed standard. NCCLS document M38-P. Wayne, 1998.
117. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidial-forming filamentous fungi. Approved standard CLSI M38-A. CLSI: Wayne, PA, 2002.
118. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, 2nd edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Approved Standard M38-A2. Available from: http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M38A2_sample.pdf. Accessed February 21, 2017.
119. Andrade TS, Castro LG, Nunes RS, Gimenes VM, Cury AE. Susceptibility of se-

quencial *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses* 2004; 47(5-6): 216-21.

120. National Committee for Clinical and Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Proposed Standard, 1992. Document M-27-P. Villanova, PA: National Committee for Clinical and Laboratory Standards.

121. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 1997. Standard M27-A. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

122. Caligiorne RB, Resende MA, Melillo PH, Peluso CP, Carmo FH, Azevedo V. *In vitro* susceptibility of chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis agents to antifungal drugs. *Med Mycol* 1999; 37(6): 405-9.

123. McGinnis MR, Pasarell L. *In vitro* testing of susceptibilities of filamentous ascomycetes to voriconazole, itraconazole and amphotericin B, with consideration of phylogenetic implications. *J Clin Clin Microbiol*. 1998. Aug;36(8):2353-5.

124. Rojas CO, León-Cachón RB, Pérez-Maya AA, Aguirre-Garza M, Moreno-Treviño MG, González GM. Phenotypic and molecular identification of *Fonsecaea pedrosoi* strains isolated from chromoblastomycosis patients in Mexico and Venezuela. *Mycoses* 2015; 58(5): 267-72. Available from: doi: 10.1111/myc.12308.

125. Daboit TC, Magagnin CM, Heidrich D, Antochévis LC, Vigolo S, Meirelles LC, et al. *In vitro* susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and to the combination of terbinafine and amphotericin B. *Mycoses* 2014; 57(2): 116-20. Available from: doi: 10.1111/myc.12111.

126. Ruiz-Cendoya M, Rodriguez MM, Mariné M, Pastor FJ, Guarro J. *In vitro* interactions of itraconazole and micafungin against clinically important filamentous fungi. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32(5): 418-20. Available from: doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.05.015.

127. González GM, Fothergill AW, Sutton DA, Rinaldi MG, Loebenberg D.

In vitro activities of new and established triazoles against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. *Med Mycol* 2005; 43(3): 281-4.

128. Odabasi Z, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Ostrosky-Zeichner L. *In vitro* activity of anidulafungin against selected clinically important mold isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(5): 1912-5.

129. Yamazaki T, Inagaki Y, Fujii T, Ohwada J, Tsukazaki M, Umeda I, et al. *In vitro* activity of isavuconazole against 140 reference fungal strains and 165 clinically isolated yeasts from Japan. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36(4): 324-31. Available from: doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.003.

130. de Bedout C, Gómez BL, Restrepo A. *In vitro* susceptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1997; 39(3): 145-8.

131. Radford SA, Johnson EM, Warnock DW. *In vitro* studies of activity of voriconazole (UK-109,496), a new triazole antifungal agent, against emerging and less common mold pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41(4): 841-3.

132. Cardona-Castro N, Agudelo-Flórez P, Restrepo-Molina R. Chromoblastomycosis murine model and *in vitro* test to evaluate the sensitivity of *Fonsecaea pedrosoi* to ketoconazole, itraconazole and saperconazole. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91(6): 779-84.

133. Poirriez J, Breuillard F, Francois N, Fruit J, Sendid B, Gross S, et al. A case of chromomycosis treated by a combination of cryotherapy, shaving, oral 5-fluorocytosine, and oral amphotericin B. *Trop Med Hyg* 2000; 63(1-2): 61-3.

134. Gomes MH, Resende MA. *Fonsecaea pedrosoi*: lipid composition and determination of susceptibility to amphotericin. *Can J Microbiol* 1992; 38(3): 209-14.

135. Deng S, de Hoog GS, Badali H, Yang L, Najafzadeh MJ, Pan B, et al. *In vitro* antifungal susceptibility of *Cladophialophora carrionii*, an agent of human chromoblastomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(4): 1974-7. Available from: doi: 10.1128/AAC.02114-12.

136. González GM, Rojas OC, Bocanegra-García V, González JG, Garza-González E.

Molecular diversity of *Cladophialophora carrionii* in patients with chromoblastomycosis in Venezuela. *Med Mycol* 2013; 51(2): 170-7. Available from: doi: 10.3109/13693786.2012.695457.

137. Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. *J Clin Microbiol* 2002; 40(10): 3776-81.

138. Espinel-Ingroff A. *In vitro* fungicidal activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol* 2001; 39(3): 954-8.

139. Guarro J, Llop C, Aguilar C, Pujol I. Comparison of *in vitro* antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(12): 2760-2.

140. Vitale RG, M. Perez-Blanco G. S. De Hoog. *In vitro* activity of antifungal drugs against *Cladophialophora* species associated with human chromoblastomycosis. *Med Mycol* 2009; 47: 35-40.

141. Li Y, Wan Z, Li R. *In vitro* activities of nine antifungal drugs and their combinations against *Phialophora verrucosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(9): 5609-12. Available from: doi: 10.1128/AAC.02875-14.

142. Vitale RG, de Hoog GS. Molecular diversity, new species and antifungal susceptibilities in the *Exophiala spinifera* clade. *Med Mycol* 2002; 40(6): 545-56.

143. Vitale RG , De Hoog GS, Verweij PE. *In vitro* activity of amphotericin B, itraconazole, terbinafine and 5 fluocytosine against *Exophiala spinifera* and evaluation of post-antifungal effects. *Med Mycol* 2003; 41(4): 301-7.

144. Vitale RG , Afeltra J, de Hoog GS, Rijs AJ, Verweij PE. *In vitro* activity of amphotericin B and itraconazole in combination with flucytosine, sulfadiazine and quinolones against *Exophiala spinifera*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(5): 1297-300.

145. Daboit TC, Duquia RP, Magagnin CM, Mendes SD, Castrillón MR, Steglich R. et

al. A case of *Exophiala spinifera* infection in Southern Brazil: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Med Mycol Case Rep* 2013; 1(1): 72-5. Available from: doi: 10.1016/j.mmcr.2012.08.006.

146. Badali H, Chander J, Bayat M, Seyedmousavi S, Sidhu S, Rani H, Attri A, Handa U, Meis JF, de Hoog GS. Multiple subcutaneous cysts due to *Exophiala spinifera* in an immunocompetent patient. *Med Mycol* 2012; 50(2): 207-13. Available from: doi: 10.3109/13693786.2011.603367.

147. Ozdemir HG, Oz Y, Ilkit M, Kiraz N. Antifungal susceptibility of ocular fungal pathogens recovered from around the world against itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and caspofungin. *Med Mycol* 2012; 50(2): 130-5. Available from: doi: 10.3109/13693786.2011.584328.

148. Meletiadiis J, Meis JF, de Hoog GS, Verweij PE. *In vitro* susceptibilities of 11 clinical isolates of *Exophiala* species to six antifungal drugs. *Mycoses* 2000; 43(7-8): 309-12.

149. Badali H, Bonifaz A, Barrón-Tapia T, Vázquez-González D, Estrada-Aguilar L, Oliveira NM, et al. *Rhinocladiella aquaspersa*, proven agent of verrucous skin infection and a novel type of chromoblastomycosis. *Med Mycol* 2010; 48(5): 696-703. doi: 10.3109/13693780903471073.

150. González GM, Rojas OC, González JG, Kang Y, de Hoog GS. Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella aquaspersa*. *Med Mycol Case Rep* 2013; 2: 148-51. doi: 10.1016/j.mmcr.2013.08.001.

151. Xu YJ, Wang C, Ho WE, Ong CN. Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. *Trends Anal Chem* 2014; 56: 37-48.

152. Lecellier A, Mounier J, Gaydou V, Castrec L, Barbier G, Ablain W. et al. Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *Int J Food Microbiol* 2014; 168-169: 32-41.

153. Gaydou V, Lecellier A, Toubas D, Mounier J, Castrec L, Barbier G, et al. Assessing the discrimination potential of linear and non-linear supervised chemometric me-

thods on a filamentous fungi FTIR spectral database. *Anal Methods* 2015; 7: 766-78.

154. Santos C, Fraga ME, Kozakiewicz Z, Lima N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Res Microbiol* 2010; 161(2): 168-75.

155. Randall HM, Smith DW, Colm AC, Nungester WJ. Correlation of biologic properties of strains of *Mycobacterium* with infrared spectrum. *Am Rev Tuberc* 1951; 63: 372–80.

156. Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* 1991; 351:81–82.

157. Naumann D, Helm D, Labischinski H, Giesbrecht P. The characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). In: Nelson WH (ed) *Modern techniques for rapid microbiological analysis*. VCH, New York, pp 43–96; 1991.

158. Helm D, Labischinski H, Naumann D. Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. *J Microbiol Methods* 1991; 14: 127–42.

159. Helm D, Labischinski H, Schallehn G, Naumann D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol* 1991; 137: 69–79.

160. Grunert T, Wenning M, Barbagelata MS, Fricker M, Sordelli DO, Buzzola FR, et al. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* capsular serotypes by means of artificial neural network-assisted Fourier transform infrared spectroscopy. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 2261–6.

161. Wenning M, Scherer S, Naumann D. Infrared spectroscopy in the identification of microorganisms. In: Diem M, Griffiths PR, Chalmers JM (eds) *Vibrational spectroscopy for medical diagnosis*. Wiley: Chichester, pp 71–96; 2008.

162. Wenning M, Scherer S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97(16):

7111-20.

163. Dixit V, Cho BK, Obendorf K, Tewari J. Identifications of household's spores using mid infrared spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2014; 123: 490-6.

164. Choo-Smith LP, Maquelin K, van Vreeswijk T, Bruining HA, Puppels GJ, Ngo Thi NA, et al. Investigating microbial (micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 1461–9.

165. Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38(4): 1599-608.

166. Sandt C, Sockalingum GD, Aubert D, Lepan H, Lepouse C, Jaussaud M, et al. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. *J Clin Microbiol* 2003; 41(3): 954-9.

167. Essendoubi M, Toubas D, Bouzaggou M, Pinon JM, Manfait M, Sockalingum GD. Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1724(3): 239-47.

168. Toubas D, Essendoubi M, Adt I, Pinon JM, Manfait M, Sockalingum GD. FTIR spectroscopy in medical mycology: applications to the differentiation and typing of *Candida*. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387(5): 1729-37.

169. Taha M, Hassan M, Essa S, Tartor Y. Use of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectroscopy for rapid and accurate identification of Yeasts isolated from human and animals. *Int J Vet Sci Med* 2013; 1: 15–20.

170. Ergin C, Vuran ME, Gök Y, Ozdemir D, Karaarslan A, Kaleli I, et al. Evaluation of *Malassezia* species by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(4): 707-15.

171. Bastert J, Korting HC, Traenkle P, Schmalreck AF. Identification of dermatophytes by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). *Mycoses* 1999; 42(9-10): 525-8.

172. Erukhimovitch V, Pavlov V, Talyshinsky M, Souprun Y, Huleihel M. FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 37(5): 1105-8.
173. Ergin Ç, İlkit M, Gök Y, Özel MZ, Çon AH, Kabay N, et al. Fourier transform infrared spectral evaluation for the differentiation of clinically relevant *Trichophyton* species. *J Microbiol Methods* 2013; 93(3): 218-223.
174. Ergin Ç, Gök Y, Bayğu Y, Gümral R, Özhak-Baysan B, Döğen A, et al. ATR FTIR Spectroscopy Highlights the Problem of Distinguishing Between *Exophiala dermatitidis* and *E. phaeomuriformis* Using MALDI-TOF MS. *Microb Ecol* 2016; 71(2): 339-46.
175. Ferreira I, Ferreira-Strixino J, Castilho ML, Campos CB, Tellez C, Raniero L. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* by FT-IR spectroscopy and nanotechnology. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2016; 152: 397-403.
176. Salman A, Pomerantz A, Tsrer L, Lapidot I, Zwielly A, Moreh R, et al. Distinction of *Fusarium oxysporum* fungal isolates (strains) using FTIR-ATR spectroscopy and advanced statistical methods. *Analyst* 2011; 136(5): 988-95.
177. Salman A, Lapidot I, Pomerantz A, Tsrer L, Shufan E, Moreh R, et al. Identification of fungal phytopathogens using Fourier transform infrared-attenuated total reflection spectroscopy and advanced statistical methods. *J Biomed Opt* 2012; 17(1): 017002. Available from: doi:10.1117/1.JBO.17.1.017002
178. Salman A, Shufan E, Tsrer L, Moreh R, Mordechai S, Huleihel M. Classification of *Colletotrichum coccodes* isolates into vegetative compatibility groups using infrared attenuated total reflectance spectroscopy and multivariate analysis. *Methods* 2014; 68(2): 325-30.
179. Gordon SH, Schudy RB, Wheeler BC, Wicklow DT, Greene RV. Identification of Fourier transform infrared photoacoustic spectral features for detection of *Aspergillus flavus* infection in corn. *Int J Food Microbiol* 1997; 35(2): 179-86.
180. Nie M, Luo J, Xiao M, Chen J, Bao K, Zhang W, et al. Structural differences

between *Fusarium* strains investigated by FT-IR spectroscopy. *Biochemistry (Mosc)* 2007; 72(1): 61-7.

181. Kümmerle M, Scherer S, Seiler H. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(6): 2207-14.

182. Timmins EM, Quain DE, Goodacre R. Differentiation of brewing yeast strains by pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *Yeast* 1998; 14(10): 885-93.

183. Paramithiotis S, Müller MRA, Ehrmann MA, Tsakalidou E, Seiler H, Vogel R, et al. Polyphasic identification of wild yeast strains isolated from Greek sourdoughs. *Syst Appl Microbiol* 2000; 23(1): 156-64.

184. Shapaval V, Møretør T, Suso HP, Asli AW, Schmitt J, Lillehaug D, et al. A high-throughput microcultivation protocol for FTIR spectroscopic characterization and identification of fungi. *J Biophotonics* 2010; 3(8-9): 512-21.

185. Shapaval V1, Schmitt J, Møretør T, Suso HP, Skaar I, Åsli AW, et al. Characterization of food spoilage fungi by FTIR spectroscopy. *J Appl Microbiol* 2013; 114(3): 788-96.

186. Shapaval V, Walczak B, Gognies S, Møretør T, Suso HP, Wold Åsli A, et al. FTIR spectroscopic characterization of differently cultivated food related yeasts. *Analyst* 2013; 21; 138(14): 4129-38.

187. Lecellier A, Gaydou V, Mounier J, Hermet A, Castrec L, Barbier G, et al. Implementation of an FTIR spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds. *Food Microbiol* 2015; 45(Pt A): 126-34.

188. Fischer G, Braun S, Thissen R, Dott W. FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of air borne filamentous fungi. *J Microbiol Methods* 2006; 64(1): 63-77.

189. Zimmermann B, Tkalčec Z, Mešić A, Kohler A. Characterizing aeroallergens by infrared spectroscopy of fungal spores and pollen. *PLoS One* 2015; 10(4): e0124240.

Available from: doi: 10.1371/journal.pone.0124240

190. Gupta AI, Vongsvivut J, Barrow CJ, Puri M. Molecular identification of marine yeast and its spectroscopic analysis establishes unsaturated fatty acid accumulation. *J Biosci Bioeng* 2012; 114(4): 411-7.

191. Büchl NR, Wenning M, Seiler H, Mietke-Hofmann H, Scherer S. Reliable identification of closely related *Issatchenkia* and *Pichia* species using artificial neural network analysis of Fourier-transform infrared spectra. *Yeast* 2008; 25(11): 787-98.

192. Mori M, Nagata Y, Niizeki K, Gomi M, Sakagami Y. Characterization of microorganisms isolated from the black dirt of toilet bowls and componential analysis of the black dirt. *Biocontrol Sci.* 2014; 19(4):173-9. doi: 10.4265/bio.19.173.

193. Naumann A. A novel procedure for strain classification of fungal mycelium by cluster and artificial neuralnetwork analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra. *Analyst* 2009; 134(6): 1215-23. doi: 10.1039/b821286d.

194. Wenning M, Seiler H, Scherer S. Fourier transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(10): 4717-21.

195. Corbellini VA, Scroferneker ML, Carissimi M, da Costa JM, Ferrão MF. Lipolytic activity of chromoblastomycosis agents measured by infrared spectroscopy and chemometric methods. *Med Mycol.* 2009; 47(1): 63-9. doi: 10.1080/13693780802566325.

196. Urán ME, Cano LE. Melanin: implications in some disease pathogenesis and its capacity to evade the host immune response. *Infect* 2008; 12 (2): 357-77.

197. Seyedmousavi S, Netea MG, Mouton JW, Melchers WJ, Verweij PE, de Hoog GS. Black yeasts and their filamentous relatives: principles of pathogenesis and host defense. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(3): 527-42. doi: 10.1128/CMR.00093-13.

198. Henson JM, Butler MJ, Day AW. The dark side of the mycelium: Melanins of Phytopathogenic Fungi. *Annu Rev Phytopathol.* 1999; 37: 447-471.

199. Ribeiro EL, Soares AJ, Ferreira WM, Cardoso CG, Naves PLF, Dias SMS. Cromoblastomicose: doença presente na realidade populacional brasileira. RBAC. 2006; 38: 189-92.
200. Franzen AJ, de Souza W, Farina M, Alviano CS, Rozental S. Morphometric and densitometric study of the biogenesis of electron-dense granules in *Fonsecaea pedrosoi*. FEMS Microbiol Lett 1999; 173(2): 395-402.
201. Franzen AJ, Cunha MM, Miranda K, Hentschel J, Plattner H, da Silva MB, et al. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. J Struct Biol 2008; 162(1): 75-84.
202. Franzen AJ, Cunha MM, Batista EJ, Seabra SH, De Souza W, Rozental S. Effects of tricyclazole (5-methyl-1,2,4-triazol[3,4]benzothiazole), a specific DHN-melanin inhibitor, on the morphology of *Fonsecaea pedrosoi* conidia and sclerotic cells. Microsc Res Tech 2006; 69: 729-37.
203. Mendoza L, Karuppayil SM, Szaniszlo PJ. Calcium regulates *in vitro* dimorphism in chromoblastomycotic fungi. Mycoses 1993; 36: 157-164.
204. Silva JP, Alviano DS, Alviano CS, de Souza W, Travassos LR, Diniz JA, et al. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* obtained *in vivo* and *in vitro*: Ultrastructure and antigenicity. FEMS Immunol Med Microbiol 2002; 33: 63-9.
205. Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. Fungal Genet Biol 2003; 38(2): 143-58.
206. Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. Cell Microbiol 2003; 5(4): 203-23.
207. Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres - Guerrero H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. Infect Immun 2000; 68: 3696-703.

208. Kogej T, Wheeler MH, Lanisnik RT, Gunde-Cimerman N. Evidence for 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 232(2): 203-9.
209. Pal AK, Gajjar DU, Vasavada AR. DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species. *Med Mycol* 2014; 52(1): 10-8.
210. Wheeler MH, Abramczyk D, Puckhaber LS, Naruse M, Ebizuka Y, Fujii I, et al. New biosynthetic step in the melanin pathway of *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*: evidence for 2-acetyl-1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene as a novel precursor. *Eukaryot Cell* 2008; 7(10): 1699-711.
211. Wheeler MH, Bhatnagar D, Rosas MG. Chlobenthiazole and tricyclazole inhibition of aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus flavus*. *Pestic Biochem Physiol* 1989; 35:15-23.
212. Kunova A, Pizzatti C, Cortesi P. Impact of tricyclazole and azoxystrobin on growth, sporulation and secondary infection of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Pest Manag Sci* 2013; 69(2): 278-84.
213. Pinto L, Granja LF, Alviano DS, da Silva MH, Alviano CS, Ejzemberg R. Activation of the human complement system by pigmented and hypopigmented mycelia of the fungus *Fonsecae pedrosoi*. *Mycoses* 2011; 54(5): 474-80.
214. Wakamatsu, K, Ito S, Rees JL. The usefulness of 4-amino-3-hydroxyphenylalanine as a specific marker of pheomelanin. *Pigment Cell Res* 2002; 15: 225–32.
215. Enochs WS, Nilges MJ, Swartz HM. Purified human neuromelanin, synthetic dopamine melanin as a potential model pigment, and the normal human substantia nigra: characterization by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Neurochem* 1993; 61: 68-79.
216. Youngchim S, Morris-Jones R, Hay RJ, Hamilton AJ. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol* 2004; 53: 175–81.
217. Bell AA, Wheeler MH. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu Rev Phytopathol.* 1986; 24(1): 411-51.

218. Peltroche-Llacsahuanga H, Schnitzler N, Jentsch S, Platz A, de Hoog S, Schweizer KG, et al. Analyses of phagocytosis, evoked oxidative burst, and killing of black yeasts by human neutrophils: a tool for estimating their pathogenicity? *Med Mycol* 2003; 41(1): 7-14.
219. Bocca AL, Brito PP, Figueiredo F, Tosta CE. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia* 2006; 161(4): 195-203.
220. Zhang J, Wang L, Xi L, Huang H, Hu Y, Li X, et al. Melanin in a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora* inhibits the production of nitric oxide and Th1 cytokines of murine macrophages. *Mycopathologia* 2013; 175(5-6): 515-22.
221. Alviano DS, Franzen AJ, Travassos LR, Holandino C, Rozental S, Ejzemberg R, et al. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. *Infect Immun* 2004; 72(1): 229-37.
222. Van Duin D, Cleare W, Zaragoza O, Casadevall A, Nosanchuk JD. Effects of Voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(6): 2014–20.

Artigo formatado para submissão à Revista
Applied microbiology and biotechnology
(artigo 1)

Rapid classification of chromoblastomycosis agents by Fourier Transform-Infrared Spectroscopy supervised by ITS rDNA region

Daiane Heidrich 1,2; Valeriano Antonio Corbellini 3; Mauricio Ramírez-Castrillón 4
Maria Lúcia Scroferneker 1,2

1 Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400 – CEP: 90035-003, Porto Alegre – RS, Brazil. daiane.heidrich@yahoo.com.br; scrofern@ufrgs.br

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

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

4 Research Group in Mycology (GIM), Research Center in Environmental Basic Sciences (CICBA), Universidad Santiago de Cali, Calle 5 62-00, Cali, Valle del Cauca, Colombia. mauriciogeteg@gmail.com

Corresponding author: Maria Lúcia Scroferneker, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 sala 325, CEP: 90050-170, Porto Alegre - RS, Brasil. Tel. (+55) 51-33083934 Fax. (+55) 51-33083121 (e-mail: scrofern@ufrgs.br)

Acknowledgements

The authors want to thank the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the financial support and scholarships. Also, we would like to thank Fernanda Gomes and Caroline Flores for technical support.

Conflict of Interest: None.

ABSTRACT

Chromoblastomycosis (CBM) is a skin fungal infection caused by species of five genera, that are identify by sequencing of one or more regions of DNA and phylogenic tree, which become an expensive and difficult work. Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FTIR) for identify other microorganisms have been used, but just one of five CBM genera was evaluating by FTIR analysis. Therefore, the aim of the study was to differentiate the CBM agents for identification at level species using FTIR supervised by ITS rDNA region. Seventy-seven isolates was prepared for Attenuated Total Reflection (ATR) with a new methodology using slices in glass fixing-modeling proposed in this study. The algorithms used to analyzing the spectra were Hierarchical cluster analysis (HCA) that showed the similarities and difference between species. Regression vector of Partial Least Square Regression (PLS) demonstrated that the principals regions of FTIR can differentiated the species, that were regions attributed to NH and OH stretching, amide I of proteins, polysaccharides bands and “fingerprint” region, proposing a model with successful cross-validation and external validation of identify CBM agents with high coefficient determination and low error. FTIR showed that can be a fast and inexpensive alternative for identification of these agents.

Key-words: FTIR; ATR; HCA; PLS; ITS

INTRODUCTION

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic and progressive cutaneous and subcutaneous infection that is considered an occupational disease, since this attacks workers exposed to contaminated soil and plant materials. CBM is caused by melanized fungi of five genera, *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Exophiala* and *Rhinocladiella* (Queiroz-Telles et al. 2017) that can be differentiate with microscopic analysis, but to distinguish at the species level, molecular identification is request. The internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA has been widely used (Queiroz-Telles et al. 2017; Sun et al. 2012). Phylonegetic trees were used for differentiate *F. pedrosoi* and *F. monophora* using this region of rDNA (Daboit et al. 2013), but an additional gene such as translation elongation factor 1 α (*TEF1*) or a partial β -tubulin gene (*BT2*) have been recommended for distinction of closely related *Fonsecaea* or *Phialophora* species (Sun et al. 2012; Najafzadeh et al. 2009). Thus, the identification of CBM agents from DNA analysis involves several steps (DNA extraction, amplification of one or more DNA regions, purification, sequencing, sequencing analysis, database comparison and, if necessary, phylogenetic tree evaluation) that in addition to being time consuming, the costs related to reagents at each stage led to the use of new tools to identify microorganisms.

In this sense, metabolomics tools are been evaluated, as Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF MS) and Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FTIR), that measure the range of metabolites present in an sample without a priori knowledge of the metabolome (Xu et al. 2014). The types of metabolites result in a complex data set that requires computational tools to identify and correlate metabolites between samples and to examine their interconnectivity (Johnson et al. 2016). The progress in speed of data acquisition have also led to the construction of large and complex datasets and sophisticated statistical methods to analyze them (Gaydou et al. 2015) and due the technology, MALDI-ToF MS and FTIR have shown considerable promise as a rapid and inexpensive methods of identification of microorganisms, including human pathogenic yeast isolates (Fraser et al. 2016; Taha et al. 2013) and species of pathogenic filamentous fungi (Becker et al. 2014; Ferreira et al. 2016; Erukhimivitch et al. 2005). However, *Exophiala* genus was the only one CBM agents in that these metabolomic tools were performed. (Broman et al. 2017; Ergin et al. 2016). Comparing the two methodologies, the FTIR is more easy and rapid, since the intact cells are used in the last one, while extraction of proteins is

necessary for MALDI-ToF MS analysis.

So, the aim of this study was differentiate the CBM agents for identification at level species using FTIR supervised by ITS rDNA region.

METHODS

Microorganisms:

Seventy seven clinical isolates of CBM agents from the fungal culture collection of Laboratory of Pathogenic Fungi, Department of Microbiology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, were evaluated. Previously, the strains were identified at genus level by macro and microscopic analyzes (Queiroz-Telles et al. 2017) and were composed by *Fonsecaea* (58), *Cladophialophora* (4), *Phialophora* (7), *Exophiala* (5) and *Rhinocladiella* (3).

Strain prepared for molecular and FTIR identifications

The strains were inoculated in potato dextrose agar (Himedia, Mumbai, Índia) at 30 °C for 10 days, when the conidial suspensions were prepared by scraping across the surface of the fungal colonies with sterile plastic loops and sterile saline solution (0.85%) and filtered with filter paper to separate hyphae and conidia (Vitale et al. 2009). Of the filtered of each strain, 500 µL was spreading in total surface of a Petri plate with 5cm of diameter containing 4mL of Sabouraud dextrose agar (Acumedia, São Paulo, Brazil) that was incubated for 14 days at 30°C. For sample purity assurance, 10 µL of the filtered was spreading with a plastic loops in another plate prepared in same conditions that was incubated at 30°C and was verified purity each 2 days until 14 days.

For molecular identification, slices with about 0.5 x 0.5 cm without media culture were used for DNA extraction. For FTIR, slices with about 1cm x 1cm of each strain with media culture include were cut using scalpel and they were placed on piece of Whatman® filter paper, number 1 (Sigma-Aldrich, USA), with about 0.8 x 0.8 cm, so that all the faces of the fungus stay in contact with the glass (which fixes the fungus during drying) and that one side of the paper stay exposed to aid removal of the fungus after drying. The slices were drayed in glass Petri plates at 50°C for 1h in a drying oven. The slices for analysis were as shown in **figure 1**.

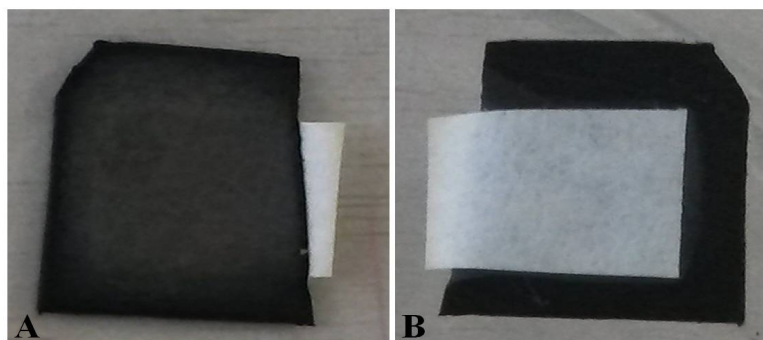


Figure 1 Slice in verse (A) and in reverse (B) with 1x1cm adhered in paper and glass of a Petri plate.

Molecular identification

Genomic DNA was extracted using *Power Soil DNA Isolation Kit* (Mobio, USA). A amplification of ITS1-5,8S-ITS2 rDNA region with primers ITS 1 and ITS 4 were performed with the next conditions: initial denaturation at 94°C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, extension at 72°C for 2 min, and final extension at 72°C for 10 min. The PCR product was purified by ExoSAP-IT® (Affymetrix, USA). Sequences were obtained with an ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), according to the manufacturer's instructions. The sequences were edited and compared to the sequences of the type strains deposited in GenBank using the BLAST algorithm. When necessary, to differentiate *Fonsecaea*, alignments and phylogenetic trees were constructed with MEGA 7 Software (The Biodesign Institute, USA) (Daboit et al. 2013), using the Maximum Likelihood and bootstrap of 500 random samplings.

Analysis by FTIR

Reflexão Total Atenuada (ATR) using Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR Spectrometer (Perkin Elmer) coupled to an Universal ATR Sampling Accessory was processed for spectrum acquisition. A plane plastic surface with 1 mm of thickness covered by aluminum foil (0.1 mm of thickness) pressed with 70 of force gauge was used as *background*. For samples, the same force gauge was used to press the samples against crystal of the equipment and every 2mm new position of the slice, a spectrum was obtained from 8 scans, totaling 5 spectrum of each strain. The spectra were recorded from 4000 to 650 cm^{-1} using a spectral resolution of 4 cm^{-1} and the OriginPro70 Software was used to compile the spectrums of the species of each genus in a unique

spectrum. All the spectra were baseline corrected and normalized by the amplitude (0-1) to eliminate the dissimilarities between spectra due to shifts in baseline (Ditix et al. 2014). Average spectra of each sample was calculated and the data set was pre-processed by sample (normalization and multiplicative scatter correction-MSC) and by variable (autoscaling or mean-centering) in Pirouette® Software (Infometrix, USA, 4,0).

Hierarchical cluster analysis (HCA) was used to display spectral similarities in a dendrogram. Ward's algorithm for cluster methods was applied to selected spectral ranges, and the squared Euclidean distance for measuring intervals was calculated for the first and second derivatives.

The partial least square regression (PLS), was used to classify the samples using their explained variables in the totally of the spectral ranges. Initially the total data set was submitted to leave-one-out cross validation for determination of optimized latent variables number according to ASTM E1655-05 (2012). In sequence, samples were organized in increasing order of prediction error and systematically separated in 2:1 ratio for leave-one-out cross validation and validation sets.

RESULTS

Molecular identification

The strains were identified with 99% of identity with type strain of each species of thirteen species distributed on five genera of CBM. The identified species were: *F. pedrosoi* (41), *F. monophora* (15), *F. pugnacious* (1), *F. nubica* (1), *C. carrionii* (3), *C. bantiana* (1), *P. verrucosa* (2), *P. americana* (5), *E. spinifera* (3), *E. xenobiotica* (2), *R. quaspersa* (1), *R. tropicalis* (1), *R. similis* (1). To differentiated *F. monophora* and *F. pedrosoi* species, we constructed phylogenetic trees and one of them was presented in **figure 2**.

Analysis by FTIR

Figure 3 shows the average of total spectrum presenting the bands found in FTIR of CBM agents (a) and the spectrums of each genus with species separately (b to f).

Figure 4 presents the dendrogram using mean-central and flexible keys obtained from HCA of total FTIR range.

Figure 5 shows the correlation curve of the CBM species identified by DNA analysis of ITS region with the species predicted by the PLS model, including the equation,

coefficient of the calibration set and r^2 and root mean square error of prediction (RMSEP) of the validation set obtained using total range of FTIR.

Figure 6 shows the regression vector of calibration set (seven latent variables obtained from cross-validation with cumulative total variance representing about 93% of total variance obtained from the original data).

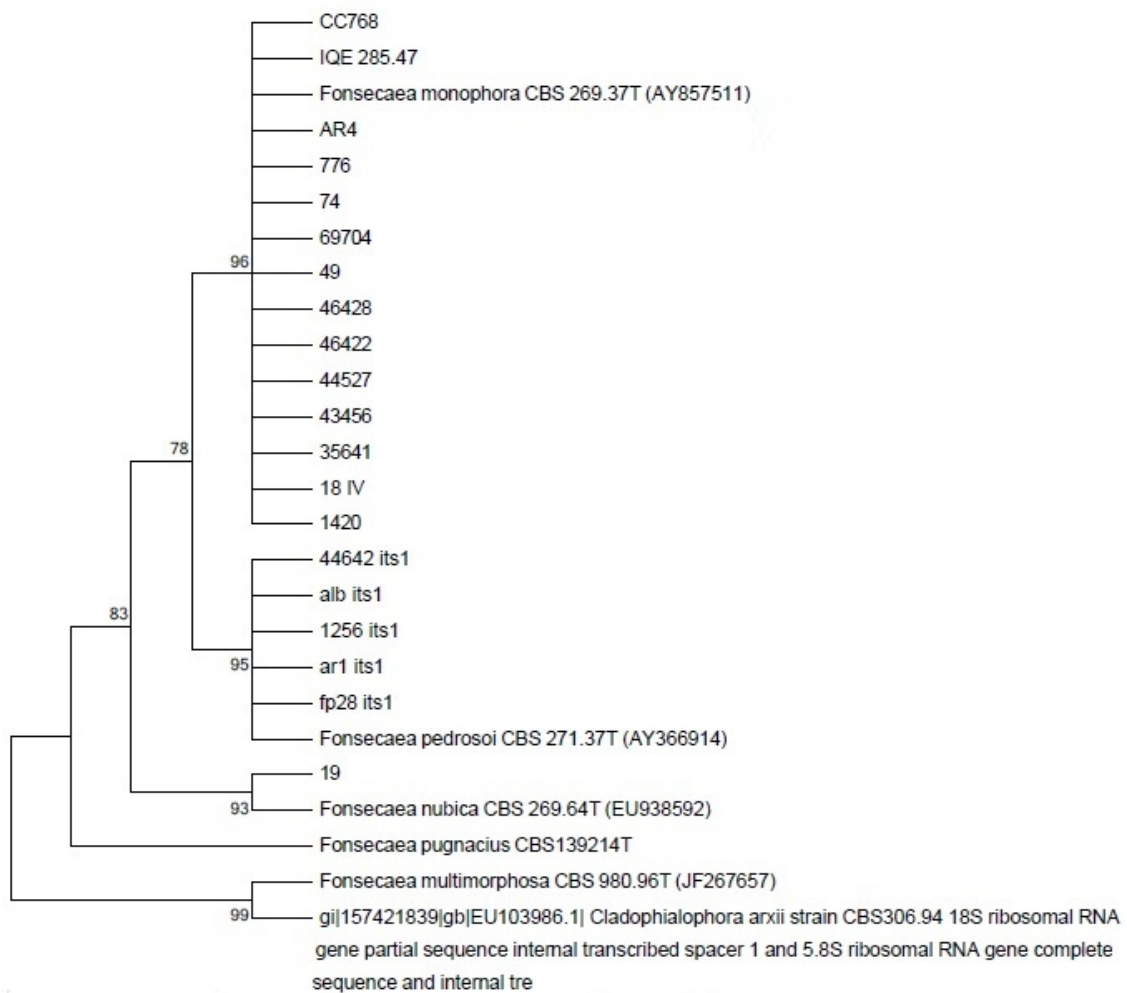


Figure 2 Phylogenetic tree of ITS1-5,8S-ITS2 rDNA region performed using Maximum Likelihood e bootstrap of 500 random samplings (MEGA 7), showing fourteen strains of *F. monophora* and five strains of *F. pedrosoi*. Type strains have a “T” at the end of the isolate’ name and *Cladophialophora arxii* CBS306.94 was used as outgroup.

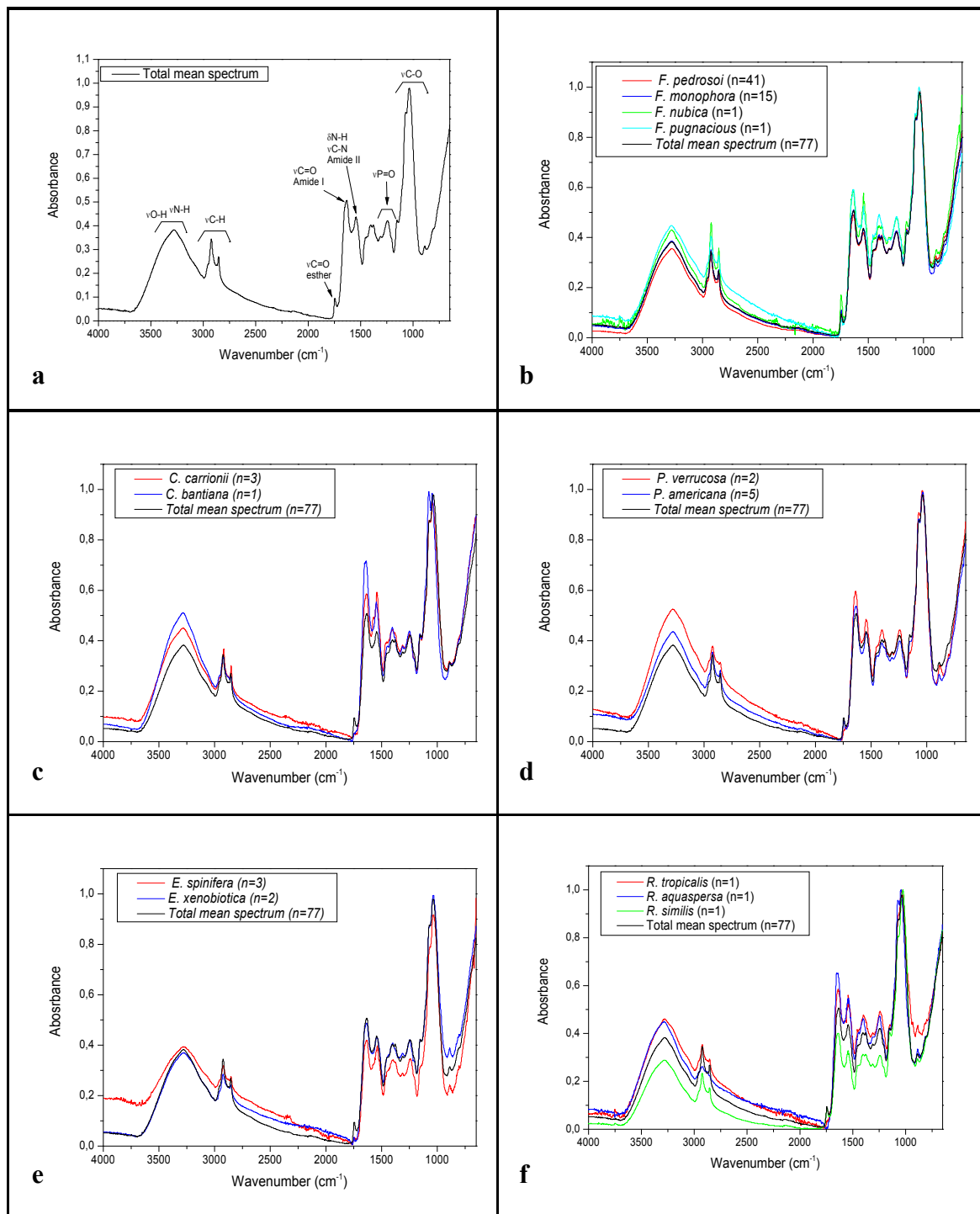


Figure 3 FTIR total spectrum presenting the bands found in chromoblastomycosis agents (a) and FTIR spectra of each genus showing the species correlated (red, blue, green and cyan lines) and the total spectrum including all isolates of all genera (black line) in region of 4000 to 650 cm^{-1} (*Fonsecaea* spp. (b); *Cladophialophora* spp. (c); *Phialophora* spp. (d); *Exophiala* spp. (e); *Rhinocladiella* spp. (f).

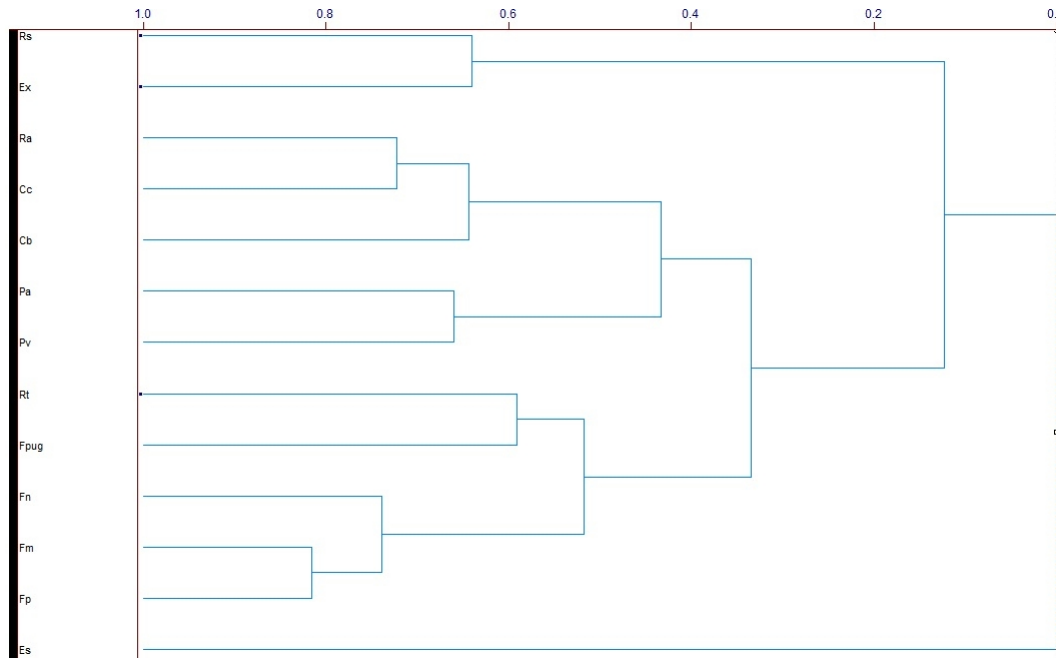


Figure 4 Dendrogram from hierarchical cluster analysis (HCA) of the average spectra of the 77 isolates of CBM agents using Mean-central and flexible keys by Ward's algorithm and the squared Euclidean distance.

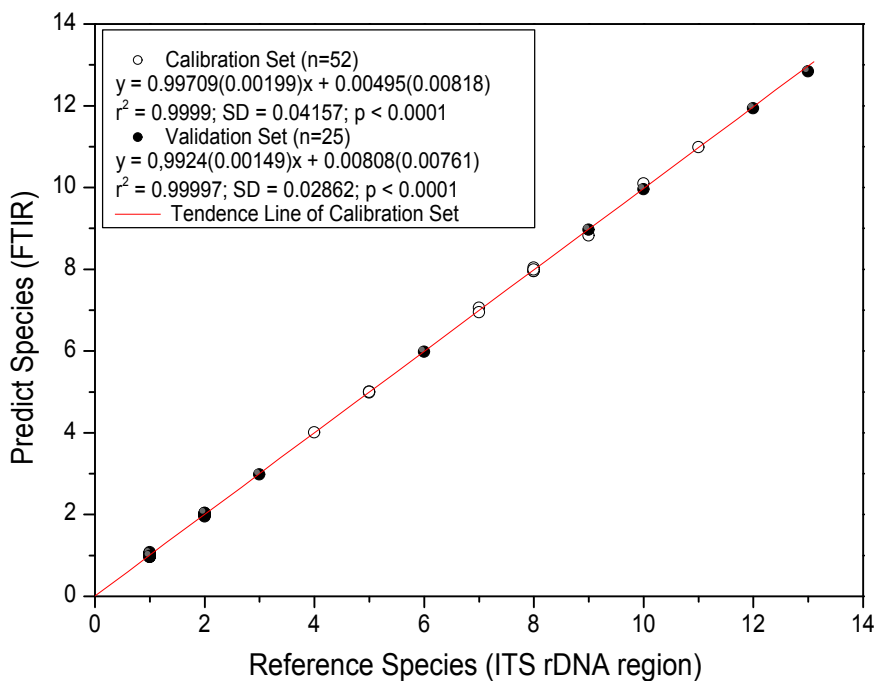


Figure 5 Calibration set and validation set curves of the CBM species identified by DNA analysis of ITS region with the species predicted by the PLSR model. The codes refers to: 1. *F. pedrosoi*, 2. *F. monophora*, 3. *F. nubica*, 4. *F. pugnacious*, 5. *C. carrionii*, 6. *C. bantiana*, 7. *P. verrucosa*, 8. *P. americana*, 9. *E. spinifera*, 10. *E. xenobiotica*, 11. *R. tropicalis*, 12. *R. aquaspersa*, 13. *R. similis*.

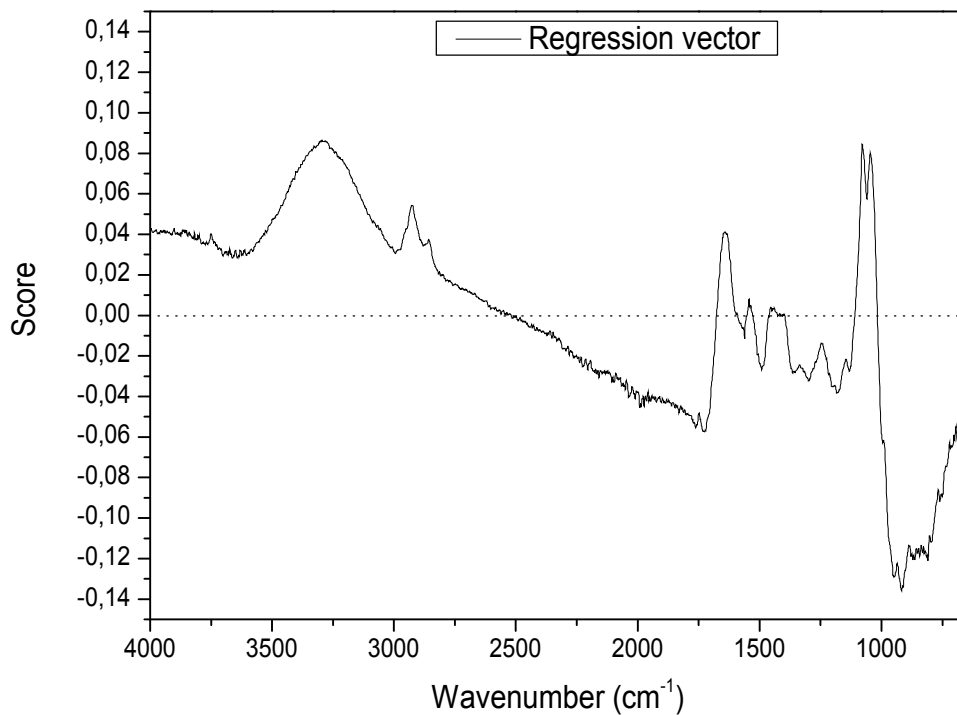


Figure 6 Regression vector of calibration set obtained by FTIR spectra of the CBM species identified by DNA analysis of ITS region.

DISCUSSION

Identification of CBM agents species using molecular biology is necessary in mycology diagnostics, because microscopy identification is unable to give this response (Queiroz-Telles et al. 2017; Sun et al. 2012). For this reason, the sequencing of ITS region, other regions of DNA and reconstruction phylogenic trees can be elucidate the reliable identification (Daboit et al. 2013; Sun et al. 2012; Najafzadeh et al. 2009). As can be observed in this study, all the seventy-seven isolates were identified. However, the expend time of qualified professionals and cost of all process lead to the non-use of this tool in clinical practice frequently. In this sense, the use of metabolomic analysis could be an efficient alternative in this case. But for identification by FTIR of pathogenic fungal, 50% of studies are about the yeast *Candida* species (Taha et al. 2013; Toubas et al. 2007; Essendoubi et al. 2005; Sandt et al. 2003; Tintelnot et al. 2000).

Of the filamentous fungi considered to be pathogenic (not opportunistic), only a few dermatophytes (*Microsporum canis* and *Trichophyton* species) (Ergin et al. 2013;

Bastert et al. 1999), *Paracoccidioides brasiliensis* (Ferreira et al. 2016), *Exophiala phaeomuriformis* and *Exophiala dermatitidis* (Ergin et al. 2016; Schmalreck et al. 1998) were evaluated by FTIR. The latter species is a cause of CBM and, so far, has been the only species that causes this disease evaluated by FTIR with the aim of differentiate for identification. The only study found in the literature that evaluated other agents of CBM had as objective the determination of the lipolytic activity of nine species by FTIR supervised by *in vitro* enzymatic assay. Thus, Corbellini et al. (2009), demonstrated that the enzymatic prediction model for FTIR can be established for these agents.

In these cited studies, there was no protocol of preparation of the filamentous fungi samples, which is an important parameter for FTIR analysis, making the compilation of spectral results difficult (Lecellier et al. 2014; Wenning and Scherer 2013; Santos et al. 2010; Neumann 2000). In addition, all the studies present a high probability of contamination of the work environment, due to the preparation of suspensions are proceeded of strong agitation of the cells and added and open surface, causing aerosols of spores. If manipulation of these fungi is performed at any stage outside the vertical laminar flow cabinet, there will be risks to the manipulator. So, the ATR technique could be performed, as well as used for environmental fungi (Mori et al. 2014; Dixit et al. 2014), with intact cultures (without agitations) coming into direct contact with the diamond crystal of the equipment, decreasing the release of spores into the environment. So, the procedure using dry slices add to the a filter paper, but with laterals fixed in a glass (**figure 1**) that was proposed in the present study, coming as a protocol more easier, with low risks and giving acquisition of good spectra.

FTIR spectrum inform allows attribution of the signal to the main macromolecular constituents (lipids, polysaccharides, nucleic acids, proteins, etc.) of the cells (Lecellier et al. 2014). How consequence, the similarity of the genus and species group form in HCA dendrograms and phylogenetic trees can be different, since the last one analyze only one or few regions of DNA. This can be observed when the dendrogram of HCA is compared with the phylogenic trees of literature. The trees show *bantiana*-clade composed for *Fonsecaea* spp. and *C. bantiana*, and *carrionii*-clade includes *C. carrionii* and *P. verrucosa*, indicating high similarity between the fungal of the same clade (Gomes et al. 2016; Queiroz-Telles et al. 2017), but in HCA, the similarities were low between *Fonsecaea* spp. and *C. bantiana* was only 33.6% and between *C. carrionii* and *P. verrucosa* represented 42.7% (**figure 4**). In contrast, some results of the two methodologies of identification were near, *E. spinifera* is used how outgroup in

phylogenetic trees of the CBM species (Queiroz-Telles et al. 2017), and in HCA, this species also showed as an outgroup. Furthermore, phylogenetic tree of the present study (**figure 2**) have almost the same result than dendrogram of HCA (**figure 4**) when comparing *F. pedrosoi* and *F. monophora*, since the species presented 78% and 81.2% of similarity, respectively.

In relation to regions bands of FTIR obtained, the regions between 4000 and 3100 cm^{-1} is assigned as the vibration modes of NH and OH stretching (Ferreira et al. 2016; Naumann 2000). This region together with the bands 1650, 1050, 1025 and the 900-800 region were the fraction of spectra of FTIR most related the difference between CBM species, as observed in **figure 6**, which shows from regression vector that the most distant bands of zero are the most important to differentiate the species (Ferreira et al. 1999). The band in 1650 can be attributed to amide I band components resulting from antiparallel pleated sheets and β -turns of proteins; $\nu(\text{C}=\text{O}) + \delta(\text{NH}_2)$ (Ferreira et al. 2016), while bands of 1050 and 1025 refer to polysaccharides bands, 1050 is attributed to galactose, glucose and fructose and 1025, to α -glucans and $\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CO})$ of fructose and sucrose (Ferreira et al. 2016). The region between 900-800 are called “fingerprint” region, that may contain weakly expressed bands arising from aromatic ring vibrations of phenylalanine, tyrosine, tryptophan and the various nucleotides (Neumann 2000). Visually, comparing the spectra showed in **figure 3**, all these regions for *F. pedrosoi* were less intense than almost totally of species, exception for *R. similis* and *E. spinifera*. Furthermore, band in 1050 of *C. bantiana* and *R. aquaspersa* are larger than the other CBM species, making this difference especially important to differentiation of this group of melanized fungal. This kind of observation was also observed by Ferreira et al. 2016, when the compared mycelia and yeast forms of *P. brasiliensis*.

The model proposed using all spectra range by PLS, could classified the thirteen CBM species, with high coefficient of determination and low error (RMSECV) of the tendency line obtained, indicating that this model can be efficient to identify the species (**figure 5**). The validation set are important request for evaluate the model proposed (Wenning and Scheree 2013). In this study, the final calibration and validation set was performed respecting the 2:1 proportion of strains and a robust and accurate model were obtained for identification of CBM agents.

This is the first study that proposed a model of classify using statistical chemometric method PLS for pathogenic filamentous fungi, but for opportunistic and food relevant filamentous fungal, there are studies with good predictions with this method (Lecieller

et al. 2015; Lecieller et al. 2014).

In conclusion, this is the first study that proposed a model using FTIR for identification of CBM agents supervised by molecular identification, showing a good performance in this field. Moreover, the new methodology used in preparation of the fungal for spectra acquisition is easier and with low risk of contamination, that could be utilized for standardizing with other pathogenic filamentous fungal.

REFERENCE

ASTM E1655-05 (Reapproved 2012); standard practices for infrared, multivariate, quantitative analysis, ASTM, West Conshohocken, PA, USA.

Bastert J, Korting HC, Traenkle P, Schmalreck AF (1999) Identification of dermatophytes by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). *Mycoses* 42(9-10):525-528. doi:10.1046/j.1439-0507.1999.00513.x.

Becker P, de Bel A, Martiny D, Ranque S, Piarroux R, Cassagne C, Detandt M, Hendrickx M (2014) Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. *Med Mycol* 52:826-834. doi:10.1093/mmy/myu064.

Borman AM, Fraser M, Szekely A, Larcombe DE, Johnson EM (2017) Rapid identification of clinically relevant members of the genus *Exophiala* by MALDI-ToF mass spectrometry and description of two novel species: *Exophiala campbellii* and *Exophiala lavatrina*. *J Clin Microbiol* 55(4):1162-1176. doi:10.1128/JCM.02459-16.

Corbellini VA, Scroferneker ML, Carissimi M, da Costa JM, Ferrão MF (2009) Lipolytic activity of chromoblastomycosis agents measured by infrared spectroscopy and chemometric methods. *Med Mycol*. 47(1):63-69. doi:10.1080/13693780802566325.

Daboit TC, Magagnin CM, Heidrich D, Castrillón MR, Mendes SD, Vettorato G, Valente P, Scroferneker ML (2013) A case of relapsed chromoblastomycosis due to

Fonsecaea monophora: antifungal susceptibility and phylogenetic analysis. *Mycopathologia* 176(1-2):139-144. doi:10.1007/s11046-013-9660-1.

Dixit V, Cho BK, Obendorf K, Tewari J (2014) Identifications of household's spores using mid infrared spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 123:490-496. doi:10.1016/j.saa.2013.11.053.

Ergin Ç, İlkit M, Gök Y, Özel MZ, Çon AH, Kabay N, Söyleyici S, Döğen A (2013) Fourier transform infrared spectral evaluation for the differentiation of clinically relevant *Trichophyton* species. *J Microbiol Methods* 93(3):218-223. doi:10.1016/j.mimet.2013.03.011.

Ergin Ç, Gök Y, Bayğu Y, Gümral R, Özhak-Baysan B, Döğen A, Ögünç D, İlkit M, Seyedmousavi S (2016) ATR FTIR spectroscopy highlights the problem of distinguishing between *Exophiala dermatidis* and *E. phaeomuriformis* using MALDI-TOF MS. *Microb Ecol* 71(2):339-346. doi:10.1007/s00248-015-0670-z.

Erukhimovitch V, Pavlov V, Talyshinsky M, Souprun Y, Huleihel M (2005) FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections. *J Pharm Biomed Anal* 37(5):1105-1108. doi:10.1016/j.jpba.2004.08.010.

Essendoubi M, Toubas D, Bouzaggou M, Pinon JM, Manfait M, Sockalingum GD (2005) Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1724(3):239-247. doi:10.1016/j.bbagen.2005.04.019.

Ferreira I, Ferreira-Strixino J, Castilho ML, Campos CB, Tellez C, Raniero L (2016) Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* by FT-IR spectroscopy and nanotechnology. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 152:397-403. doi:10.1016/j.saa.2015.07.061.

Ferreira MMC, Antunes AM, Melgo MS, Volpe PLO (1999) Chemometrics I: Multivariate calibration, a tutorial. *Quim Nova* 22(5):724-731. doi.org/10.1590/S0100-40421999000500016.

Fraser M, Brown Z, Houldsworth M, Borman AM, Johnson EM (2016) Rapid identification of 6328 isolates of pathogenic yeasts using MALDI-ToF MS and a

simplified, rapid extraction procedure that is compatible with the Bruker Biotyper platform and database. *Med Mycol* 54:80-88. doi:10.1093/mmy/myv085.

Gaydou V, Lecellier A, Toubas D, Mounier J, Castrec L, Barbier G, Ablain W, Manfait M, Sockalingum GD (2015) Assessing the discrimination potential of linear and non-linear supervised chemometric methods on a filamentous fungi FTIR spectral database. *Anal. Methods* 7:766-778. doi:10.1039/c4ay01712a.

Gomes RR, Vicente VA, Azevedo CM, Salgado CG, da Silva MB, Queiroz-Telles F, Marques SG, Santos DW, de Andrade TS, Takagi EH, Cruz KS, Fornari G, Hahn RC, Scroferneker ML, Caligine RB, Ramirez-Castrillon M, de Araújo DP, Heidrich D, Colombo AL, de Hoog GS (2016) Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species. *PLoS Negl Trop Dis* 10(11):e0005102. doi:10.1371/journal.pntd.0005102.

Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G (2016) Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17(7):451-459. doi:10.1038/nrm.2016.25.

Lecellier A, Mounier J, Gaydou V, Castrec L, Barbier G, Ablain W, Manfait M, Toubas D, Sockalingum GD (2014) Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *Int J Food Microbiol* 168-169:32-41. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.011.

Lecellier A, Gaydou V, Mounier J, Hermet A, Castrec L, Barbier G, Ablain W, Manfait M, Toubas D, Sockalingum GD (2015) Implementation of an FTIR spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds. *Food Microbiol* 45:126-134. doi:10.1016/j.fm.2014.01.002.

Mori M, Nagata Y, Niizeki K, Gomi M, Sakagami Y (2014) Characterization of microorganisms isolated from the black dirt of toilet bowls and componential analysis of the black dirt. *Biocontrol Sci* 19(4):173-179. doi:10.4265/bio.19.173.

Najafzadeh MJ, Gueidan C, Badali H, Van Den Ende AH, Xi L, De Hoog GS (2009) Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. *Med Mycol* 47(1):17-25. doi:10.1080/13693780802527178.

Naumann D (2000) Infrared spectroscopy in microbiology. In: Meyers, R.A. (Ed.), Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 102–131.

Queiroz-Telles F, de Hoog S, Santos DW, Salgado CG, Vicente VA, Bonifaz A, Roilides E, Xi L, Azevedo CM, da Silva MB, Pana ZD, Colombo AL, Walsh TJ (2017) Chromoblastomycosis. Clin Microbiol Ver 30(1):233-276. doi:10.1128/CMR.00032-16.

Sandt C, Sockalingum GD, Aubert D, Lepan H, Lepouse C, Jaussaud M, Leon A, Pinon JM, Manfait M, Toubas D (2003) Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. J Clin Microbiol 41(3):954-959. doi:10.1128/JCM.41.3.954–959.2003.

Santos C, Fraga ME, Kozakiewicz Z, Lima N (2010) Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeast. Res Microbiol 161(2):168-175. doi:10.1016/j.resmic.2009.12.007.

Schmalreck AF, Tränkle P, Vanca E, Blaschke-Hellmessen R (1998) Differentiation and characterization of yeasts pathogenic for humans (*Candida albicans*, *Exophiala dermatitidis*) and algae pathogenic for animals (*Prototheca* spp.) using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in comparison with conventional methods. Mycoses 41(1):71-77.

Sun J, Najafzadeh MJ, Gerrits van den Ende AH, Vicente VA, Feng P, Xi L, De Hoog GS (2012) Molecular characterization of pathogenic members of the genus *Fonsecaea* using multilocus analysis. PLoS One 7(8):e41512. doi:10.1371/journal.pone.0041512.

Taha M, Hassan M, Essa S, Tartor Y (2013) Use of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectroscopy for rapid and accurate identification of Yeasts isolates from human and animals. Int J Vet Sci Med 1:15–20. doi:10.1016/j.ijvsm.2013.03.001.

Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, Naumann D (2000) Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliensis*. J Clin Microbiol 38(4):1599-1608. doi: 0095-1137/00/\$04.0010.

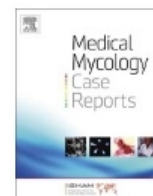
Toubas D, Essendoubi M, Adt I, Pinon JM, Manfait M, Sockalingum GD (2007) FTIR spectroscopy in medical mycology: applications to the differentiation and typing of *Candida*. *Anal Bioanal Chem* 387(5):1729-1737. doi:10.1007/s00216-006-1005-1.

Vitale RG, Perez-Blanco M, De Hoog GS (2009) *In vitro* activity of antifungal drugs against *Cladophialophora* species associated with human chromoblastomycosis. *Med Mycol* 47(1):35-40. doi:10.1080/13693780802566333.

Xu YJ, Wang C, Ho WE, Ong CN (2014) Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 56:37-48.

Wenning M, Scherer S (2013) Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(16):7111-7120. doi:10.1007/s00253-013-5087-3.

Artigo publicado na Revista
Medical Mycology Case Reports
(artigo 2)



Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella similis*: Case report

Daiane Heidrich^a, Gloria M. González^b, Danielle M. Pagani^c, Mauricio Ramírez-Castrillón^c,
Maria Lucia Scroferneker^{a,b,*}



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

^b Department of Microbiology, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Madero y Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro, Monterrey, N.L. C.P. 64460, Mexico

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Rhinocladiella similis
Chromoblastomycosis
In vitro antifungal susceptibility
Molecular identification
NTD

ABSTRACT

We report a case of chromoblastomycosis in lesions on the chest and foot. Itraconazole was chosen as the initial treatment for this patient, who was followed up for 8 months before becoming noncompliant. The pathogenic fungal species was identified as *Rhinocladiella similis* by ITS region sequencing. *In vitro* analyses indicate that the fungus was sensitive to posaconazole and itraconazole. This report presents *R. similis* as a new agent of chromoblastomycosis and raises the hypothesis that this species could be more resistant to some antifungals than *R. aquaspersa*.

1. Introduction

Chromoblastomycosis is a tropical and subtropical skin disease caused by environmental accidental inoculation of pathogenic fungi. For instance, this disease often affects farmers, and it is believed that the fungus penetrates the skin through injuries caused by contaminated environmental debris. Chromoblastomycosis is a chronic granulomatous infection characterized by muriform cells, tissue proliferation, and microabscess, which may cause several complications to the health of affected individuals [1], including the inability to work if not treated in the early stages. This fungal skin infection is characterized as one of the Neglected Tropical Diseases (NTD) [2], a cover term for a group of ignored infectious diseases affecting the poorest regions in the world [3].

Rhinocladiella is a genus of melanized fungi that can cause chromoblastomycosis. Taxonomically, the *Rhinocladiella* genus belongs to the Chaetothyriales order (Ascomycota). This order contains several clinically relevant species of the genera *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Fonsecaea*, and *Phialophora*, which are possible etiologic agents of chromoblastomycosis and/or phaeohyphomycosis [1, 2, 4, 5]. *Rhinocladiella similis* was isolated for the first time in a human ulcerated foot lesion characterized as chromoblastomycosis, whose report was published in a congress abstract book M. A. Resende, R. B. Caligiorno, C. R. Aguilar and M. M. Gontijo, Abstr. 14th Congr. Int. Soc. Human Anim. Mycol., p. 274, 2000 [4]. Later, *R. similis* was isolated from environmental samples [6], such as hemodialysis water [7], tap water and groundwater [8].

We, therefore, herein report the first case published in a scientific journal and the second case published in the worldwide literature of *R. similis* causing chromoblastomycosis.

2. Case

In 2002, a 47-year-old, Mexican rural worker male patient presented asymptomatic scaly lesions on the dorsum of the left foot and on the chest. According to the patient, these manifestations had started 4 years before the physician office visit. The first lesion appearances were characterized as small plaques on the foot, and then later lesions arose on the chest. The patient also declared having no history of traumatic injury in these regions. Upon examination, several erythematous verrucous plaques were seen on both chest and foot (Fig. 1A).

In the same day of his first presence in hospital, direct and culture microscopic examinations were performed. Direct microscopic examination of plaques with KOH (20%) revealed muriform cells (5–7 μm in diameter; Fig. 1B) characterizing a chromoblastomycosis and the oral treatment with itraconazole (200 mg/day) was started immediately. Cultures were performed in Sabouraud dextrose agar (Difco, USA) supplemented with chloramphenicol (0.5 mg/ml) and incubated at 30°C for 14 days. Both macroscopic (Fig. 1C) and microscopic analyses supported the identification of *Rhinocladiella* sp. colonies.

The patient was followed up during 8 months, and lesion improvement was observed despite his intermittent noncompliance. After this period, the patient quit the treatment.

* Corresponding author at: Department of Microbiology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite, 500, Room 210, Porto Alegre CEP: 90050-170, Brazil.
E-mail addresses: gloria62@hotmail.com (G.M. González), scrofern@ufrgs.br (M.L. Scroferneker).



Fig. 1. (A) Chest lesion caused by *Rhinocladiella similis*. (B) Sclerotic cells from a lesion sample observed by optic microscopy (400X). (C) Colonial morphology from *R. similis* in PDA after incubation at 35°C for 14 days.

Thirty two months after his visit, the patient reappear presenting active lesions in the same places, but he did not want to restart the treatment and did not return to further consultation.

For fourteen years the isolate was maintained in bank collection of fungal in Mexico laboratory. In Brazilian laboratory, the identification at level species was performed with its grown for 14 days in Sabouraud broth at 30°C, without shaking. Total genomic DNA was extracted and purified from cultures using the *Power Soil DNA Isolation Kit* (Mobio, USA). Sequencing of the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region was performed using the universal primers ITS1 and ITS4. The amplification conditions were: initial denaturation at 94°C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, extension at 72°C for 2 min, and final extension at 72°C for 10 min [5]. The PCR product was purified using ExoSAP-IT (Affymetrix, USA) and sequenced in the ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. The sequence was assembled and compared with sequences of type strains reported in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm. The etiologic agent was confirmed as *Rhinocladiella similis*, since it presented sequence identity at 99% and coverage at 98% with the type strain of this species (CBS 111763). This strain was added to GenBank as number KY657562.

Due to the low effectiveness of itraconazole observed in patient, the absence of an antifungal test in the literature against this new agent of chromoblastomycosis, and the existence of an *in vitro* antifungal activity protocol, made available in 2008, the antifungal assay was evaluated with the isolate. Therefore, the susceptibility assay was performed according to the protocol M38-A2 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), utilizing the microdilution technique [9]. For inoculum preparation, *Rhinocladiella similis* isolates were grown on potato dextrose agar at 30°C for 14 days. The colonies were covered with approximately 3mL 0.85% sterile saline solution, and a suspension was prepared by scraping across all colonies with a rigid sterile plastic loop. The suspension was filtered through a filter paper to separate hyphae and conidia. Conidial-only presence in suspensions was verified by microscopy, and the conidia quantitation was performed with a Neubauer chamber [10]. The final concentration in the wells was 2.5×10^4

CFU/mL [9-11].

The following antifungals were evaluated: amphotericin B, itraconazole, ketoconazole, voriconazole, posaconazole and terbinafine (all from Sigma-Aldrich, USA) in the final concentration range of 0.03–16 $\mu\text{g/mL}$ [9]. The incubation temperature was 35°C for up to five days [11]. The minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined when there was 100% of visual inhibition by comparing antifungal concentration to the growth in the drug-free wells (growth control) [9]. This assay was performed in triplicate.

After evaluating the MIC, the minimum fungicidal concentration (MFC) was determined. A 50 μl aliquot from the wells in which no growth was observed was transferred to a plate (1 mL 96-well type plate) containing 800 μL /well of Sabouraud-dextrose broth. The plate was incubated for 15 days at 30°C and growth was visually observed. MFC was defined as the minimum concentration in which no fungal growth occurred [12]. This assay was performed in duplicate.

The MIC obtained of antifungals were ($\mu\text{g/mL}$): posaconazole and terbinafine (0.5); itraconazole (1.0); ketoconazole and voriconazole (2.0); amphotericin B (8.0). The MFC of posaconazole was 2.0 $\mu\text{g/mL}$ and for all the others, the MFC were $\geq 16.0\mu\text{g/mL}$.

1. Discussion

With the advent of molecular biology, it has been noticed that clade *Exophialia spinifera* contains several morphologically similar species, being *Rhinocladiella similis* one of them [4, 13]. For many years, fungal identification was based on micro and macroscopic characteristics, which led to a series of misidentifications, leading to under- or overestimation of the number of infection cases caused by different species [4, 5]. Currently, in research, the identification based on sequencing of the Internal Transcribed Spacer (ITS) region of ribosomal DNA has been considered a reliable source of identification for this clade [13], but it has not been frequently used in clinical practices.

This is the first report published in a scientific journal and the second case published in the worldwide literature of *Rhinocladiella similis* as chromoblastomycosis agent. The first case was isolated before 2000 from the foot of a 72-year

old Caucasian male in Minas Gerais, Brazil, and the report was presented at a scientific meeting (M. A. Resende, R. B. Caligorne, C. R. Aguilar and M. M. Gontijo, Abstr. 14th Congr. Int. Soc. Human Anim. Mycol., p. 274, 2000). This

isolate was identified as *R. similis* in 2003 and it became the type strain for comparison in Genbank (CBS 111763) [4]. The following species of the genus *Rhinocladiella* have also been reported to relate to chromoblastomycosis: *R. aquaspersa*, a classical chromoblastomycosis agent [1, 2]; *R. tropicalis*, which was isolated from 4 Brazilian patients [1]; and *R. phaeophora*, whose only report derives from a case in Thailand [14].

In the case presented herein, lesions were observed both on the foot, a common site of chromoblastomycosis lesion, and in the chest, which is less common. Typically, disease dissemination occurs slowly, with continuous propagation around the infection source; in contrast, noncontiguous or remote-site lesions may result from autoinoculation caused by itching [2]. In this case, the primary lesion was on the foot, whereas autoinoculation may have occurred on the chest, given the distance to those lesions without lymphatic progression.

Using the cutoff proposed by CLSI [9], the isolate was considered sensitive to posaconazole and itraconazole. The isolate response was characterized as intermediate to voriconazole and resistant to amphotericin B. For terbinafine and ketoconazole, there is no reference of cutoff in the protocol.

The MICs of posaconazole and voriconazole against *R. similis* were similar to those of both antifungals against *R. aquaspersa* [10, 15], and the MICs of ketoconazole, itraconazole, terbinafine and amphotericin B were similar to those against two other strains of the genus [11]. However, the *R. similis* isolate presented MICs 3-fold higher for these last three antifungals, in comparison to *R. aquaspersa*, indicating that *R. similis* may be less susceptible than *R. aquaspersa* to those antifungals. This is an important observation because itraconazole is the standard therapy for chromoblastomycosis [2]. Therefore, according to these results, treatment with itraconazole may result ineffective or of decreased effectiveness when the infection is caused by *R. similis*. Taking this into account, identification at the species level of *Rhinocladiella* spp. and/or antifungal susceptibility assay should be performed in clinical practices to avoid a treatment with low effectiveness.

To our knowledge, the MFC test for *Rhinocladiella* genus causing chromoblastomycosis had not been reported until now. For this isolate, MFCs of the antifungals (except for posaconazole) were high, indicating lower fungicidal activity against *R. similis*, which can make the treatment difficult if the patient is immunocompromised [12].

In this case, itraconazole was chosen as the initial treatment for the patient in 2002 because it was and still is the standard medication against CBM agents [2] and evaluating the *in vitro* antifungal test performed in 2016, the isolate was considered sensitive to itraconazole, since it was in the concentration range. Terbinafine and posaconazole, antifungals that have low MIC (both) and MFC (posaconazole), are expensive drugs [2] for the patient's economic condition, therefore they would not be used as treatment.

The duration of treatment with itraconazole is variable, but a range from 8 to 10 months has been reported in many cases [2]. The patient's follow-up occurred during the first 8 months of treatment, and lesion regression was observed. Unfortunately, after this period the patient quit the treatment, returning 2 years later with active lesions which were probably due to the intermittent and incomplete therapy. Thus, it is impossible to inform if the treatment with itraconazole would be effective against *R. similis* if the patient had properly followed treatment.

This report present *R. similis* as a new agent of chromoblastomycosis and raise the hypothesis that this species could be more resistant to some antifungals, such as itraconazole, than *R. aquaspersa*. In addition, this article stress the importance of species-level identification and antifungal susceptibility testing in clinical practice.

2. Acknowledgements

The authors thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the scholarships and Comissão de Pesquisa de Ciências Básicas da Saúde from Universidade Federal do Rio Grande do Sul for the financial support (23903).

3. Conflict of Interest

None.

4. References

- [1] R.R. Gomes, V.A. Vicente, C.M.P.S. Azevedo, C.G. Salgado, M.B. da Silva, F. Queiroz-Telles, et al. Molecular epidemiology of agents of human chromoblastomycosis in Brazil with the description of two novel species, PLOS Neglected Tropical Diseases. 10 (2016) 1-20.
- [2] F. Queiroz-Telles, S. de Hoog, D.W.C.L. Santos, C.G. Salgado, V.A. Vicente, A. Bonifaz, et al. Colombo, T.J. Walsh, Chromoblastomycosis, Clin Microbiol Rev. 30 (2017) 233-76.
- [3] J. Utzinger, S.L. Becker, S. Knopp, J. Blum, A.L. Neumayr, J. Keiser, et al. Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control, Swiss Med Wkly. 142 (2012) 1-24.
- [4] G. S. de Hoog, V. Vicente, R. B. Caligiorno, S. Kantarcioglu, K. Tintelnot, A. H. G. Gerrits van den Ende, et al. Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi, J. Clin. Microbiol. 2003 41 (2003) 4767-78.
- [5] T. C. Daboit, R.P. Duquia, C.M. Magagnin, S.D.C. Mendes, M.R. Castrillón, R. Steglich, et al. A case of *Exophiala spinifera* infection in Southern Brazil: Molecular identification and antifungal susceptibility, Med Mycol Case Reports. 1 (2012) 72-5.
- [6] H. Madrid, M. Hernández-Restrepo, J. Gené, J. Cano, J. Guarro, V. Silva, New and interesting chaetothyrialean fungi from Spain, Mycol Progress. 15 (2016) 1179-1201.
- [7] I.C. Figel, P.R.D. Marangoni, S.M. Tralamazza, V.A. Vicente, P. do R. Dalzoto, M.M.F. do Nascimento, et al. Black yeasts-like fungi Isolated from dialysis water in hemodialysis units, Mycopathologia. 175 (2013) 413-20.
- [8] M.N. Babic, P. Zalar, B. Zenko, S. Dzeroski, N. Gunde-Cimerman, Yeasts and yeast-like fungi in tap water and groundwater, and their transmission to household appliances, Fung Ecol. 20 (2016) 30-9.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. 2nd edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008—Approved Standard M38-A2.
- [10] G.M. González, O.C. Rojas, J.G. González, Y. Kang, G.S. de Hoog, Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella aquaspersa*, Med Mycol Case Rep. 2 (2013) 148-51.
- [11] T.C. Daboit, C.M. Magagnin, D. Heidrich, L.C. Antochévis, S. Vígolo, L.C. Meirelles, et al. In vitro susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs to the combination of terbinafine and amphotericin B, Mycoses. 57 (2014) 116-20.
- [12] C.M. Magagnin, C.D. Stopiglia, F.J. Vieira, D. Heidrich, M. Machado, G. Vettoratto, et al. Antifungal susceptibility of dermatophytes isolated from patients with chronic renal failure, An Bras Dermatol. 86 (2011) 694-701.
- [13] J.S. Zeng, G.S. de Hoog, *Exophiala spinifera* and its allies: diagnostics from morphology to DNA barcoding, Med Mycol. 46 (2008) 193-208.
- [14] K. Kampirapap, S. Reangchainam, P. Ornpaew, P. Tresukosol, Chromoblastomycosis masquerading as dermatophytosis, with the description of a new opportunistic species, Southeast Asian J Trop Med Public Health. 46 (2015) 105-09.
- [15] H. Badali, A. Bonifaz, T. Barrón-Tapia, D. Vázquez-González, L. Estrada-Aguilar, N.M. Oliveira, et al. *Rhinocladiella aquaspersa*, proven agent of verrucous skin infection and a novel type of chromoblastomycosis, Med Mycol. 48 (2010) 696-703.

Artigo formatado de acordo com a Revista

Medical Mycology

(artigo 3)

**Melanin biosynthesis inhibition increases the susceptibility to antifungals in
chromoblastomycosis agents**

Short title:

Chromoblastomycosis: melanin influence in susceptibility to antifungals

Daiane Heidrich 1,2; Karine de Oliveira Alves 2; Maria Lúcia Scroferneker 1,2

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

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

Corresponding author: Maria Lúcia Scroferneker, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 sala 325, CEP: 90050-170, Porto Alegre - RS, Brasil. Tel. (+55) 51-33083934 Fax. (+55) 51-33083121 (e-mail: scrofern@ufrgs.br)

Key-words: DHN melanin; tricyclazole; antifungal susceptibility

ABSTRACT

Chromoblastomycosis is a chronic subcutaneous infection caused by genera of melanized fungi. Influence of melanin in antifungal susceptibility of other fungi had been cited in other studies. Moreover, there was none antifungal susceptibility evaluated for some species. Therefore, the aims of this study were: to evaluate the influence of melanin in chromoblastomycosis agents in response to antifungals by tricyclazole inhibition of melanin and to compare the susceptibility to antifungals in species previously identified by molecular analyzes. Seventy-eight isolates representing 13 species of five genera of chromoblastomycosis agents were maintained in medium with or without tricyclazole before and during antifungal susceptibility assay with six antifungals. The M38-A2 protocol of CLSI was followed and statistical analyzes were performed. Principal results showed that: DHN melanin inhibition by tricyclazole can increase the susceptibility of chromoblastomycosis agents to itraconazole, posaconazole, terbinafine and amphotericin B; Analyzing Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) of ketoconazole and voriconazole, the difference between species of the same genus was highlight when the DHN inhibition occurred; MICs of terbinafine, voriconazole and ketoconazole of genus *Fonsecaea* are lower than other genera; terbinafine was the best antifungal tested against genera *Fonsecaea*, *Phialophora* and two species of *Rhinocladiella*; voriconazole or posaconazole had the lowest MICs of *Cladophialophora*, *R. tropicalis* and *F. pugnacious*; amphotericin B and itraconazole had the highest MICs; The most of genera had distinct MICs in their species for, at least, one antifungal. These findings showed the importance of the application of molecular methods and the antifungal susceptibility assay in clinical practices.

INTRODUCTION

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic and progressive cutaneous and subcutaneous infection that is considered an occupational disease, when workers are exposed to contaminated soil and plant materials. CBM is caused by melanized fungi of five genera, *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Exophiala* and *Rhinocladiella*¹ that can be differentiated with microscopic analysis, but to distinguish at the species level, molecular identification is required and the Internal Transcribed Spacer (ITS) region of ribosomal DNA has been widely used^{1, 2}. However, some CBM species have not been evaluated for antifungal susceptibility to date.

The melanin in the wall of the vegetative and parasitic cells of the CBM agents is a polymer derived from 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN melanin)^{3,4} acting in protection against aggressive environmental factors^{5,6} and as a virulence factor, being considered an immunologically active compound, since these cells can easily avoid phagocytosis⁷, resist to burst oxidative⁸ and the presence of the pigment can activate the complement system of the host⁹.

DOPA melanin can bind chemically to the antifungal agents amphotericin B and caspofungin, increasing their concentrations required to inhibit fungal growth^{10,11}. For DHN melanin, the minimal inhibitory concentrations (MICs) obtained were 16-fold higher for itraconazole (ITZ) and 32-fold higher for ketoconazole (KTZ) against *Madurella mycetomatis*, when melanin was added in the culture medium¹². However, there were no significant differences in the susceptibility of these samples to eight antifungals compared to two melanized and two albino isolates of *F. monophora*⁶. This result may be a reflection of the low number of isolates tested and none study was found evaluating the other species that cause CBM.

A specific inhibitor of the production of DHN melanin is 5-methyl-1,2,4-triazol[3,4]

benzothiazole (tricyclazole) that in concentration of 16 µg/mL in culture medium, did not cause alteration in the viability of *F. pedrosoi* cells¹³ and therefore, this inhibitor has been used in experiments with fungi belonging to the same genus¹⁴.

Therefore, the principal aim of this study was to evaluate the correlation between the presence of melanin in chromoblastomycosis agents and their *in vitro* response to antifungals by tricyclazole inhibition of DHN melanin. Moreover, the second aim was to compare the susceptibility to antifungals in species previously identified by molecular analyzes.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms

Seventy eight clinical isolates of CBM agents from the fungal culture collection of Laboratory of Pathogenic Fungi, Department of Microbiology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, were evaluated. Previously, the strains were identified by molecular sequencing of ITS1-5,8S-ITS2 DNA region. The strains were representative of thirteen species distributed on five genera of CBM, were: *F. pedrosoi* (42), *F. monophora* (15), *F. nubica* (one), *F. pugnacius* (one), *C. carrionii* (three), *C. bantiana* (one), *P. verrucosa* (two), *P. americana* (five), *E. spinifera* (three), *E. xenobiotica* (two), *R. quaspersa* (one), *R. tropicalis* (one), *R. similis* (one). The strain *Candida krusei* ATCC 6258 was used as quality control.

Inoculum preparation

The strains were inoculated paired in potato dextrose agar (Himedia, Mumbai, Índia) in the presence and absence of 16 µg/mL tricyclazole (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) dissolved previously with ethyl alcohol 96°G. After 14 days at 30 °C, the conidial suspensions were prepared by scraping across the surface of the fungal colonies with

sterile plastic loops and sterile saline solution (0.85%) and filtered with filter paper to separate hyphae and conidia. The presence of conidia in suspensions were verified by microscopy and the count of conidia were performed with Neubauer chamber¹⁵⁻²³. Conidial viabilities were confirmed by colony count determination. The final concentration standardized was $1.5-4 \times 10^4$ conidia/mL in each well in the susceptibility assay²⁴.

Antifungal agents and susceptibility testing

The minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by the microdilution technique according to the M38-A2 protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), except for the addition of 16 $\mu\text{g/mL}$ tricyclazole¹³ in RPMI 1640 plus 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) medium used for the assay with DHN melanin inhibited.

The antifungals were acquired from Sigma-Aldrich, Missouri, USA and were evaluated amphotericin B (AMB), itraconazole (ITZ), ketoconazole (KTZ), voriconazole (VRZ), posaconazole (PSZ) and terbinafine (TRB) in the final concentration range of 0.03–16 $\mu\text{g/mL}$ ²⁴. Incubation was at 35 °C for up to five days²⁵. The minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined when there were 100% of visually inhibition by comparison of the growth in the wells containing drug-free (growth control)²⁴.

Statistical analysis

Wilcoxon and Kruskal-Wallis statistical tests were performed using SPSS version 18, considering $\alpha=0.05$.

RESULTS

The **table 1** shows the Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) of antifungals obtained for each genus exposed or not to tricyclazole (pathway of DHN-melanin

inhibitor), while **table 2** shows the (MICs) of antifungals obtained for each species when they were exposed or not to tricyclazole.

The numbers of p-values (p1 to p4) showed in tables refers to:

p1 = comparison of MICs with and without tricyclazole for each antifungal (for **table 1 and 2**);

p2 = comparison of MICs' genus (**table 1**) and species within the same genus (**table 2**) for the same antifungal and condition (with or without tricyclazole);

p3 = comparison of MICs of antifungals for the same genus (**table 1**) and species (**table 2**) when the test was without tricyclazole (pathway of DHN-melanin was not inhibited);

p4 = comparison of MICs of antifungals agents for the same genus (**table 1**) and species (**table 2**) when the test was with tricyclazole (pathway of DHN-melanin was inhibited).

DISCUSSION

In the present study, the genera *Phialophora* and *Fonsecaea*, and its related species *F. pedrosoi* and *F. monophora*, had statistical differences in response to ITZ and PSZ (all of them) and TRB (*Fonsecaea* spp. and *F. pedrosoi*) when DHN melanin was inhibited by tricyclazole, they became more sensitive to these antifungal agents when melanin was inhibited (**p1**<0.05). Besides this, 79.5% of the melanin not inhibited isolates was considered resistant to AMB, using 4µg/mL as cut off for sensitive/resistant in these fungi²⁴. However, 10 isolates (three *F. pedrosoi*, three *F. monophora*, one *P. verrucosa*, two *P. americana* and one *R. tropicalis* – data not shown) changed their profile of resistant to sensitive for AMB when the melanin was inhibited, indicating that the possibility of utilization of medicine able to inhibit the melanization of these fungi in tissue could help to improve AMB activity, as well as it could help ITZ, PSZ and TRB.

Table 1. Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) of antifungals obtained for each genus exposed or not to tricyclazole (pachway of DHN-melanin inhibitor).

Genus	n	Antifungals (Medians and range - µg/mL) tested with or without tricyclazole (16µg/mL)															p ³	p ⁴			
		Terbinafine			Voriconazole			Posaconazole			Ketoconazole			Itraconazole					Amphotericin B		
		Without	With	p ¹	Without	With	p ¹	Without	With	p ¹	Without	With	p ¹	Without	With	p ¹			Without	With	p ¹
<i>Fonsecaea</i>	59	0.125 ^{C,E} I,K,P,A 0.06-1	0.03 ^{E,R} _{all} 0.03-1	*	0.125 ^{P,E} _{I,A} 0.03-1	0.25 ^{P,R} _{T,A} 0.06-1	0.25 _{I,T,A} 0.03-2	0.125 _{I,T,A} 0.03-2	*	0.25 ^{P,R} _{I,T,A} 0.03-2	0.25 ^{P,E,R} _{T,A} 0.03-2	0.5 _{all} 0.03->16	0.5 _{P,T,A} 0.03-2	*	4 _{all} 1-16	4 _{all} 2->16	*	*			
<i>Cladophialophora</i>	4	0.5 ^{F,P} 0.25-4	0.03 _A 0.03-1		0.187 ^E _A 0.06-1	0.25 0.125-4	0.25 _A 0.06-0.5	0.187 0.125-0.5		0.25 ^R 0.125-1	0.187 ^R 0.125-2	0.75 0.5-1	0.375 0.125-1		5 _{P,V} 2-8	3 _T 2-8	*	*			
<i>Phialophora</i>	7	0.06 ^{C,E,R} _A 0.03-0.125	0.03 ^{E,R} _{K,V,A} 0.03-0.125		0.5 ^F 0.25-4	1 ^F _T 0.125-2	0.5 0.25-1	0.125 _A 0.06-0.5	*	1 ^F 0.125-2	0.5 ^F _T 0.06-2	0.5 0.25-1	0.125 0.06-1	*	8 _T 4-8	4 _{P,T} 0.5-16	*	*			
<i>Exophiala</i>	5	1 ^{F,P} 0.25-8	0.25 ^{F,P} 0.03-4		1 ^{F,C} 1-4	0.5 0.125-8	0.25 _A 0.125-0.5	0.25 0.03-1		0.5 0.25-4	1 ^F 0.125-4	1 0.25-4	0.5 0.06-1		4 _P 0.5-16	8 0.5-16	*	*			
<i>Rhinochadiella</i>	3	0.5 ^P 0.5-0.5	0.25 ^{F,P} _A 0.125-0.25		2 0.125-2	1 ^F 0.5-2	0.5 0.125-1	0.25 0.125-1		2 ^{F,C} 2-2	2 ^F 2-4	1 0.5-2	0.5 0.25-0.5		4 1-8	8 _T 2-16		*			
Geral	78	0.125 _{I,K,P,A} 0.03-8	0.03 _{all} 0.03-4	*	0.25 [#] _{I,A} 0.06-4	0.25 _{T,A} 0.06-8	0.25 _{I,T,A} 0.03-2	0.125 _{I,T,A} 0.03-1	*	0.25 _{I,T,A} 0.03-4	0.25 _{T,A} 0.03-4	0.5 _{all} 0.06->16	0.5 _{P,T,A} 0.03-2	*	4 _{all} 0.5-16	4 _{all} 0.5->16	*	*			
		p ²	*	*	*	*				*	*										

p¹ = p-value in comparison of MICs with and without tricyclazole for each antifungal. Wilcoxon statistical test, using SPSS vs. 18

* p<0.05 for the statistical analyses performed.

p² = p-value in comparison of MICs' genus for the same antifungal and condition (with or without tricyclazole). Kruskal-Wallis, using SPSS vs. 18. (p<0.05)

^{F,C,P,E,R}: Initials of genera superscripted when there was statistical difference with this genus for the same antifungal (p<0.05).

p³ = adjusted p-value in comparison of MICs of antifungals agents for the same genus when the test was without tricyclazole (pachway of DHN-melanin was not inhibited). Kruskal-Wallis statistical test, using SPSS vs. 18.

p⁴ = adjusted p-value in comparison of MICs of antifungals agents for the same genus when the test was with tricyclazole (pachway of DHN-melanin was inhibited). Kruskal-Wallis statistical test, using SPSS vs. 18.

all, I, K, P, V, T, A: Antifungals subscript when there was statistical difference with this antifungal for the same species (p<0.05).

Table 2. Minimals Innibitory Concentrations (MICs) of antifungals obtained for each species exposted or not to tricyclazole (pachway of DHN-melanin inhibitor) .

Species	n	Antifungals (Medians and range - µg/mL) tested with or without tricyclazole (16µg/mL)														p ³	p ⁴	
		Terbinafine			Voriconazole		Posaconazole			Ketoconazole		Itraconazole			Amphotericin B			
		Without	With	p ¹	Without	With	Without	With	p ¹	Without	With	Without	With	p ¹	Without			With
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	42	0.125 I,K,P,A 0.03-1	0.03 _{all} 0.03-1	*	0.25 [#] _{I,A} 0.06-1	0.25 _{T,A} 0.125-1	0.375 _{I,T,A} 0.06-1	0.187 _{P,T,A} 0.03-1	*	0.25 _{I,T,A} 0.06-2	0.25 [#] _{T,A} 0.125-2	1 _{all} 0.125->16	0.5 _{P,T,A} 0.06-2	*	4 _{all} 1-16	4 _{all} 2->16	*	*
<i>Fonsecaea monophora</i>	15	0.06 _{I,A} 0.03-0.5	0.06 _{I,V,A} 0.03-0.25		0.125 [#] _A 0.06-0.25	0.25 _{T,A} 0.06-0.5	0.25 _A 0.03-2	0.06 _A 0.03-0.25	*	0.25 _A 0.03-1	0.125 [#] _A 0.03-2	0.5 _T 0.06-1	0.25 _{T,A} 0.03-1	*	8 _{K,P,V,T} 1-8	4 _{all} 2-32	*	*
<i>Fonsecaea nubica</i>	1	0.06	0.06		0.125	0.125	0.25	0.25		0.125	0.25	0.5	0.5		2	8		
<i>Fonsecaea pugnacius</i>	1	0.5	0.03		0.125	0.25	0.125	0.03		0.125	0.125	0.5	0.25		2	8		
<i>Cladiphialophora carrionii</i>	3	0.5 0.25-0.5	0.03 _A 0.03-0.06		0.125 _A 0.06-0.25	0.25 [#] 0.125-0.25	0.25 0.06-0.5	0.25 0.125-0.5		0.25 0.125-0.25	0.125 [#] 0.125-0.25	1 0.5-1	0.25 0.125-1		8 _V 2-8	4 _T 2-8	*	*
<i>Cladiphialophora bantiana</i>	1	4	1		1	4 [#]	0.25	0.125		1	2 [#]	0.5	0.5		2	2		
<i>Phialophora verrucosa</i>	2	0.06 0.06-0.06	0.045 0.03-0.06		0.375 0.25-0.5	0.312 [#] 0.125-0.5	0.375 0.25-0.5	0.092 0.06-0.125		0.562 0.125-1	0.53 0.06-1	0.375 0.25-0.5	0.125 0.125-0.125		4 4-4	4.25 0.5-8		
<i>Phialophora americana</i>	5	0.125 _A 0.03-0.125	0.03 _{V,A} 0.03-0.125		0.5 0.25-4	1 [#] _T 1-2	0.5 0.25-1	0.125 _A 0.06-0.5		1 0.25-2	0.5 0.5-2	1 0.5-1	0.5 0.06-1		8 _T 8-8	4 _{P,T} 2-16	*	*
<i>Exophiala spnifera</i>	3	1 1-8	1 0.25-4		1 1-4	1 [#] 0.5-8	0.5 0.25-0.5	0.25 0.03-1		0.5 0.5-4	1 1-4	1 0.25-4	0.25 0.06-1		2 [#] 0.5-4	2 0.5-8		
<i>Exophiala xenobiotica</i>	2	2.125 0.25-4	0.077 0.03-0.125		2.5 1-4	0.187 [#] 0.125-0.25	0.187 0.125-0.25	0.25 0.25-0.25		0.25 0.25-0.25	0.312 0.125-0.5	0.75 0.5-1	0.5 0.5-0.5		12 [#] 8-16	12 8-16		
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i>	1	0.5	0.125		2	1	1	1		2	4	2	1		2	4		
<i>Rhinocladiella tropicalis</i>	1	0.5	0.25		0.125	0.5	0.125	0.125		2	2	0.5	0.25		4	2		
<i>Rhinocladiella similis</i>	1	0.5	0.25		2	2	0.5	0.25		2	2	1	0.5		8	8		
	p ²				#	#				#					#			

p¹ = p-value in comparison of MICs with and without tricyclazole for each antifungal. Wilcoxon statistical test, using SPSS vs. 18 (* p<0.05).

p² = p-value in comparison of MICs' species within the same genus for the same antifungal and condition (with or without tricyclazole). Kruskal-Wallis, using SPSS vs. 18. (#p<0.05)

p³ = adjusted p-value in comparison of MICs of antifungals agents for the same species when the test was without tricyclazole (pachway of DHN-melanin was not inhibited). Kruskal-Wallis statistical test, using SPSS vs. 18.

p⁴ = adjusted p-value in comparison of MICs of antifungals agents for the same species when the test was with tricyclazole (pachway of DHN-melanin was inhibited). Kruskal-Wallis statistical test, using SPSS vs. 18.

all, I, K, P, V, T, A: Antifungals subscript when there was statistical difference with this antifungal for the same species (p<0.05).

The influence of melanin on antifungals profiles can be related to bind antifungals to DHN melanin as it was found in DOPA melanin in other studies that suggested that fungal melanin binds to antifungals and prevents them from reaching their target sites^{10,11,26}. Comparing DHN and DOPA melanin results, their presence or absence influenced the activity of AMB and did not change the MICs of VRZ, but according to the type of melanin, ITZ had discrepant results, this antifungal can alter just DNH and not DOPA. To confirm the binding of antifungals to DHN melanin and to understand the difference on binding in each melanin, further studies are required.

The unique study found evaluating the influence on melanin to antifungal in CBM agents was described by Sun et al., 2011⁶. In this study, there was no difference between the response to eight antifungal when compared strains considered melanized due presence of cell-wall-associated melanin (one of them was a dysplastic mutant isolate from patient and the other was a strain obtained by subculturing the mutant isolate during two years) with strains considered albinos for the absence or limited presence of secreted melanin (the two strains were provided also by subculturing the mutant isolate during two years). However, the natural mutant isolate that origin all the strains was considered mutant because its thallus was subhyaline under microscopy²⁷. Therefore, probably, the strains considered melanized had less melanin than a non-mutant isolate and this fact may be responsible for the results obtained in this study.

Beyond the genera *Fonsecaea* and *Phialophora*, the antifungal ITZ, PSZ and TRB in the other genera also seem to have their MICs decreased in presence of tricyclazole, but there was no statistical support to affirm this, probably due to the low number of isolates tested with the other genera. This is also the reason of *P. verrucosa* or *P. americana* had no statistical difference in ITZ or PSZ when they were separate in species from genus, the number of each species were low (two and five, respectively). The low number of

several species in this study is justified by the rarity of this species causing chromoblastomycosis¹. Also due to the difficulty in keeping these samples in the laboratory and in acquiring samples from the laboratories of the outpatient clinics. Twelve of the isolates were from other countries: Argentina (four *F. pedrosoi*; one *F. monophora* and one *P. americana*), Spain (three *F. pedrosoi*), Paraguay (one *F. pedrosoi*) and Peru (one *F. monophora*). However, most of the samples used in this work are from all Brazilian' regions, in which *F. pedrosoi* is the most prevalent between the chromoblastomycosis agents^{1,28}. Therefore, the number of the species is discrepant. Thence, some statistical analyses were no significant or could not be performed, and more isolates would be needed to give statistical support for some results.

There were statistical differences in MICs of TRB, VRZ and KTZ comparing genera (**Table 1: p2<0.05**). Few studies were found using statistical analyzes to determine if the sensitive grade to some antifungal is equal or not in different genera of CBM agents^{25, 29}. In the present study, *Fonsecaea* had the lowest MICs of these antifungal when the statistical test was significant in comparison with any genera, in presence and/or absence of tricyclazole, they were: *Exophiala* and *Rhinocladiella* for KTZ, VRZ and TRB; *Cladophialophora* for TRB; *Phialophora* for KTZ and VRZ. *Cladophialophora* spp. had lower MICs when compared to *Exophiala* spp. (VRZ) and *Rhinocladiella* spp. (KTZ). *Phialophora* spp. had lower MICs than genus *Cladophialophora*, *Exophiala* and *Rhinocladiella* when sensibility to TRB was compared. Similar results were found in one of the studies for genus *Fonsecaea* versus *Exophiala* (TRB), *Rhinocladiella* (KTZ) and *Phialophora* (KTZ) and *Phialophora* versus *Exophiala* (TRB)²⁵ and some results were distinct for another study in relation to *Cladophialophora* sp. that in the study by Yu et al., 2008²⁹ was more susceptibility to TRB than genera *Fonsecaea* and *Phialophora*. Thus, there was a larger number of

isolates of *Cladophialophora* sp. (22) in comparison with the present study (four), it is possible to realize that *Cladophialophora* isolated in Brazil (range: 0.25-4 μ g/mL) is less susceptible to TRB than isolates from China (range: 0.01-0.13 μ g/mL).

For comparison of species into the same genus, no study was found in literature using statistical analyzes, but Najafzadeh et al., 2010³⁰, cited that there were no differences between *F. pedrosoi* and *F. monophora* when they were tested against AMB, ITZ, VCZ, PSZ, fluconazole, isavuconazole, caspofungin, and anidulafungin. In the present study, *F. monophora* was statistical less sensitive than *F. pedrosoi* to VCZ and *E. xenobiotica* had MICs of AMB 6x upper than *E. spinifera* when melanin was not inhibited (**Table 2: p2**<0.05), indicating that *F. monophora* and *E. xenobiotica* can be, naturally, less susceptible to this antifungal than the other species of the same genus. When DHN melanin was inhibited, the differences between species of the same genus for KTZ and VRZ were highlighted that can be due to possible differences between characterization and/or quantification of melanin in species. These differences were: *C. bantiana*, which had higher MICs of both antifungal than *C. carrionii*; *F. pedrosoi* had higher MICs of KTC in comparison to *F. monophora*; *P. americana* and *E. spinifera* had higher MICs of VRZ than *P. verrucosa* and *E. xenobiotica*, respectively.

In vitro antifungal susceptibility has never been tested before for *F. pugnacius*, *P. Americana* and *R. tropicalis*. Recently, the two species related to *Rhinocladiella* were inserted as CBM agents, the first was described as a novel species of fungi that was isolated from patients²⁸ and the second was isolated from patient with CBM, this case was presented in a Congress (M. A. Resende, R. B. Caligiorne, C. R. Aguilar and M. M. Gontijo, Abstr. 14th Congr. Int. Soc. Human Anim. Mycol., p. 274, 2000), and another case was published with *R. similis* causing CBM.

Although there was no significant differences when evaluating the three strains of

Rhinocladiella genus, MICs of VRZ and PSZ were visibly upper in *R. aquaspersa* and *R. similis* than *R. tropicalis* in absence or presence of tricyclazole, while *R. aquaspersa* was more susceptible to AMB than the two species of the same genus. Besides *R. tropicalis* and *R. similis*, the resistance-like to AMB in all isolates was observed in *P. verrucosa* (two), *P. americana* (five) and *E. xenobiotica* (two). These results indicated that it is important to identify *Rhinocladiella* and *Exophiala* at species level, because the profile of sensibility to AMB can be different for each CBM species of these genera. Unlike *Phialophora*, that both species had a near profile of all antifungal when the melanin was not inhibited.

Rhinocladiella spp. did not show statistical differences between antifungal in absence of tricyclazole (**Table 1: p3**>0.05), but AMB showed higher average MIC than TRB in presence of tricyclazole (**Table 1: p4**<0.05). AMB had higher MICs for, at least, one antifungal in each genus, suggesting that this antifungal may not be the best treatment alternative, since higher doses would be required to be effective as monotherapy. But a study testing *in vitro* combination of AMB and TRB was performed, showing synergism between the two antifungal against isolates of genera *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora* and *Rhinocladiella*²⁵. In addition, other studies also found the highest MICs for AMB between all antifungal tested in several genus or species^{15,17,18,25,29,31,32,33}. TRB had the lowest MICs than ITZ, KTZ and PSZ for genus *Fonsecaea* and, probably, the same result was not observed for *Phialophora* spp. and *Rhinocladiella* spp. due to the low number of isolates for each genus. Although there is no statistical support for most studies, TRB had the best result in 100% of studies that tested this antifungal against *Phialophora* sp.²⁵; *P. verrucosa*^{20,29}; *Rhinocladiella* sp.²⁵ and *Rhinocladiella aquaspersa*¹⁸. TRB also had the best results in some studies against *Fonsecaea* sp.²⁵; *F. pedrosoi*^{15,29}; *F. monophora*³⁴, but in other studies TRB was inferior

to PSZ³⁵ or VRZ³⁶. TRB has never been tested until the present study against to *F. nubica*, *C. bantiana* and *E. xenobiotica*, to our knowledge. This antifungal presented low MIC for the first and higher MICs for the last two species.

Within the azolics, ITZ was less effective, presenting upper MICs than VRZ, PSZ and KTZ. Besides this, ITZ had the highest variation in MICs of isolates from *F. pedrosoi* (range: 0.125 to >16 µg/mL) with resistance-like of 9.5% of its isolates and 16.7% of the isolates with intermediate response (data not shown). These results are important, since ITZ is considered the standard treatment to CBM¹, indicating that is vital the antifungals susceptibility assay in clinical practices and that identification at level species for genus *Fonsecaea* is not enough to determine the best antifungal to administrate. Alternatively, the use of other potential antifungal *in vitro*, as TRB, VRZ or PSZ, can be used to avoid the risk of infection with resistant type of *Fonsecaea*, waste of time and money spent on antifungal susceptibility assays for the isolates. However, the cost of the treatment with one of these antifungals, which are not funded by the Brazilian government like as ITZ, would lead to many patients not adhering to treatment. It is relevant to observe that the antifungals assays of the literature is based on evaluation in response of conidia form of the CBM and not the parasitic form (sclerotic cells) and these results could be different according to the form evaluate¹. Unfortunately, no methodology has achieved maintenance of the sclerotic cell form *in vitro* from the patient's clinical material. However, some methods were proposed on literature for the transformation of conidia into sclerotic cells, some of this about 90% of transformation³⁷, but the standard assay established is difficult, due the indissociated groups of sclerotic cells that is naturally formed. For these reasons, some clinical trials and case reports are being suggesting the use of combination of antifungal with some physical treatment, as liquid nitrogen cryotherapy³⁸⁻⁴⁰ or photodynamic therapy^{34,36,41},

which can reduce in the time of antifungal administration, leading to a less harmful treatment for the patient as well as decreasing the cost of the treatment. Evaluation of these therapies using other antifungals, as VRZ or PSZ, is interesting, since the clinical trials performed were all using ITZ^{38,39,41} besides that there were two case report that used TRB^{34,40} and another TRB plus ITZ³⁶ combined with photodynamic therapy, which showed an effective response in both cases.

In general, for genera *Fonsecaea*, *Phialophora* and *Rhinoctadiella*, the major sensitivity was to TRB, followed by VRZ, PSZ, KTZ and ITZ. This order is also found significant for some species of two genera (*F. pedrosoi*, *F. monophora* and *P. americana* – **table 2: p3** and **p4**<0.05). Evaluating each species, some studies showed similar sequences, although they have not tested all antifungals, they were: *F. pedrosoi*²⁹; *F. monophora*^{30,34,36}; *P. verrucosa*²⁹. However, others studies, which tested less isolates, cited ITZ as the best among azolics for *F. pedrosoi*^{15,30}, but MICs were lower than in the present study.

For *C. carrionii* and without tricyclazole in the medium, TRB had no significant MIC, and VRZ, PSZ and KTZ had better results than TRB. Similar phenomenon occurred in the present study as well as in other studies with *C. bantiana* (PSZ<ITZ<VRZ)⁴², and *E. xenobiotica* (PSZ<KTZ<ITZ).

Although the sensibility grade to the majority of antifungals may be the same into isolates of each species, there was heterogeneity in MICs in isolates of *F. pedrosoi* (ITZ, AMB), *F. monophora* (AMB), *P. americana* (VRZ), *E. spinifera* (VRZ, KTZ, ITZ, AMB), *E. xenobiotica* (VRZ), indicating that in these species, there were strains sensitive-like and resistant-like to these antifungals, suggesting that the evaluation of antifungals susceptibility assays is important to determine the profile of a specific isolate that may help in the choice of ideal treatment in relation to inhibition of fungi.

In conclusion, this study showed that the DHN melanin inhibition by tricyclazole can increase the susceptibility of CBM agents to ITZ, PSZ, TRB and AMB. For MICs of KTZ and VRZ, the difference between species of the same genus was highlight when the DHN inhibition occurred. The antifungals susceptibility of isolates without DHN melanin inhibited: MICs of TRB, VRZ and KTZ of genus *Fonsecaea* are lower than other genera of CBM; TRB was the best antifungal tested against genera *Fonsecaea* (except *F. pugnacious*), *Phialophora* and the species *R. aquaspersa* and *R. similis*; VRZ or PSZ had the lowest MICs of *Cladophialophora*, *R. tropicalis* and *F. pugnacious*; AMB had the highest MICs between antifungals tested and ITZ had higher MIC of azolics tested; All genera had distinct MICs in their species for, at least, one antifungal, except for species of *Phialophora* genus, that had no difference between species, but they had difference on VRZ grade potential for *P. americana* isolates. These findings showed the importance of the application of molecular methods and the antifungal susceptibility assay in clinical practices.

Acknowledgements

The authors want to thank the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the financial support and scholarships. Also, we would like to thank Carina Alves Timotheo and Danielle Machado Pagani for contributing in the language review and for the submission of this paper.

Conflict of Interest

None.

REFERENCE

1. Queiroz-Telles F, de Hoog S, Santos DW, et al. Chromoblastomycosis. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(1):233-276.
2. Sun J, Najafzadeh MJ, Gerrits van den Ende AH, et al. Molecular characterization of pathogenic members of the genus *Fonsecaea* using multilocus analysis. *PLoS One.* 2012;7(8):e41512.
3. Nosanchuk JD, Casadevall A. 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2003;5(4):203-223.
4. Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres- Guerrero H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun.* 2000;68:3696–3703.
5. Li XQ, Guo BL, Cai WY, et al. The role of melanin pathways in extremotolerance and virulence of *Fonsecaea* revealed by de novo assembly transcriptomics using illumine paired-end sequencing. *Stud Mycol.* 2016;83:1-18.
6. Sun J, Zhang J, Najafzadeh MJ, et al. Melanization of a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora* increases tolerance to stress factors while no effects on antifungal susceptibility. *Mycopathologia.* 2011;172(5):373-80.
7. Farbiarz SR, de Carvalho TU, Alviano C, de Souza W. Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells in vitro. *J Med Vet Mycol.* 1992;30(4):265-73.
8. Rozental S, Alviano CS, de Souza W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. *Mycopathologia.* 1994;126:85–91.
9. Pinto L, Granja LF, Alviano DS, da Silva MH, Alviano CS, Ejzemberg R. Activation of the human complement system by pigmented and hypopigmented mycelia of the fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycoses.* 2011;54(5):e474-480.

10. Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiol Immunol.* 2003;47:271–277.
11. Van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibility to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002;46:3394–3400.
12. van de Sande WW, de Kat J, Coppens J, et al. Melanin biosynthesis in *Madurella mycetomatis* its effect on susceptibility to itraconazole and ketoconazole. *Microbes Infect.* 2007;9(9):1114-1123.
13. Franzen AJ, Cunha MM, Batista EJ, Seabra SH, De Souza W, Rozental S. Effects of tricyclazole (5-methyl-1,2,4-triazol[3,4]benzothiazole), a specific DHN-melanin inhibitor, on the morphology of *Fonsecaea pedrosoi* conidia and sclerotic cells. *Microsc Res Tech.* 2006;69:729-737.
14. Cunha MM, Franzen AJ, Seabra SH, et al. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiol.* 2010;10:80.
15. Rojas CO, León-Cachón RB, Pérez-Maya AA, Aguirre-Garza M, Moreno-Treviño MG, González GM. Phenotypic and molecular identification of *Fonsecae pedrosoi* strains isolated from chromoblastomycosis patients in Mexico and Venezuela. *Mycoses.* 2015;58(5):267-272.
16. González GM, Fothergill AW, Sutton DA, Rinaldi MG, Loebenberg D. In vitro activities of new and established triazoles against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. *Med Mycol.* 2005;43(3):281-284.
17. González GM, Rojas OC, Bocanegra-García V, González JG, Garza-González E. Molecular diversity of *Cladophialophora carrionii* in patients with chromoblastomycosis in Venezuela. *Med Mycol.* 2013;51(2):170-177.
18. González GM, Rojas OC, González JG, Kang Y, de Hoog GS. Chromoblastomycosis

- caused by *Rhinocladiella aquaspersa*. *Med Mycol Case Rep.* 2013;2:148-151.
19. Vitale RG, Perez-Blanco M, De Hoog GS. In vitro activity of antifungal drugs against *Cladophialophora* species associated with human chromoblastomycosis. *Med Mycol.* 2009;47:35-40.
20. Li Y, Wan Z, Li R. In vitro of nine antifungal drugs and their combinations against *Phialophora verrucosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(9):5609-5612.
21. Vitale RG, de Hoog GS. Molecular diversity, new species and antifungal susceptibilities in the *Exophiala spinifera* clade. *Med Mycol.* 2002;40(6):545-556.
22. Vitale RG, de Hoog GS, Verweij PF. In vitro activity of amphotericin B, itraconazole, terbinafine and 5-fluocytosine against *Exophiala spinifera* and evaluation of post-antifungal effects. *Med Mycol.* 2003;41(4):301-307.
23. Vitale RG, Afeltra J, de Hoog GS, Rijs AJ, Verweij PE. In vitro activity of amphotericin B and itraconazole in combination with flucytosine sulfadiazine and quinolones against *Exophiala spinifera*. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(5):1297-1300.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, 2nd edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Approved Standard M38-A2. http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M38A2_sample.pdf. Accessed February 21, 2017.
25. Daboit TC, Massotti Magagnin C, Heidrich D. et al. *In vitro* susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and to the combination of terbinafine and amphotericin B. *Mycoses.* 2014;57:116 –120.
26. Van Duin D, Cleare W, Zaragoza O, Casadevall A, Nosanchuk JD. Effects of voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2014–2020.

27. Xi L, Lu C, Sun J, et al. Chromoblastomycosis caused by a meristematic mutant of *Fonsecae monophora*. *Med Mycol*. 2009;47(1):77-80.
28. Gomes RR, Vicente VA, Azevedo CM, et al. Molecular epidemiology of agents of human chromoblastomycosis in Brazil with the description of two novel species. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(11):e0005102.
29. Yu J, Li R, Zhang M, Liu L, Wan Z. In vitro interaction of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblastomycosis in China. *Med Mycol*. 2008;46:745–747.
30. Najafzadeh MJ, Badali H, Ilnait-Zaragozi MT, De Hoog S, Meis JF. In vitro activities of eight antifungal drugs against 55 clinical isolates of *Fonsecaea* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:1636-1638.
31. Daboit TC, Magagnin CM, Heidrich D, et al. A case of relapsed chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora*: antifungal susceptibility and phylogenetic analysis. *Mycopathologia*. 2013;176(1-2):139-144.
32. Odabasi Z, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Ostrosky-Zeichner L. In vitro activity of anidulafungin against selected clinically important mold isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(5):1912-1915.
33. Daboit TC, Duquia RP, Magagnin CM, et al. A case of *Exophiala spinifera* infection in Southern Brazil: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Med Mycol Case Rep*. 2012;1(1):72-75.
34. Hu Y, Huang X, Lu S, et al. Photodynamic therapy combined with terbinafine against chromoblastomycosis and the effect of PDT on *Fonsecaea monophora* in vitro. *Mycopathologia*. 2015;179:103-109.
35. Badali H, Fernandez-Gonzales M, Mousavi B, et al. Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* and *F. monophora* in Cuba. *Mycopathologia*. 2013;175:439-444.

36. Yang Y, Hu Y, Zhang J, Li X, Lu C, Liang Y, Xi L. A refractory case of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora* with improvement by photodynamic therapy. *Med Mycol.* 2012;50:649-653.
37. da Silva MB, da Silva JP, Sirleide Pereira Yamano S, Salgado UI, Diniz JA, Salgado CG. Development of natural culture media for rapid induction of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells in vitro. *J Clin Microbiol.* 2008;46(11):3839-3841.
38. Ranawaka RR, Amarasinghe N, Hewage D. Chromoblastomycosis: combined treatment with pulsed itraconazole therapy and liquid nitrogen cryotherapy. *Int J Dermatol.* 2009;48(4):397-400.
39. Bonifaz A, Martínez-Soto E, Carrasco-Gerard E, Peniche J. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery and combination of both. *Int J Dermatol.* 1997;36:542-547.
40. Bassas-Vila J, Fuente M, Guinovart R, Ferrándiz C. Cromomicosis. Respuesta al tratamiento combinado con crioterapia y terbinafina. *Actas Dermosifiliogr.* 2014;105:196-198.
41. Lyon JP, Pedroso e Silva Azevedo CDM, Moreira LM, de Lima CJ, de Resende MA.. Photodynamic antifungal therapy against chromoblastomycosis. *Mycopathologia.* 2011;172:293–297.
42. Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. *J Clin Microbiol.* 2002;40(10):3776-3781.

Artigo submetido na Revista

Mycoses

(artigo 4)

Melanin confers protection against oxidative stress in chromoblastomycosis agents

Daiane Heidrich^{1,2}; Sandra Denise Camargo Mendes³; Elissa Kerli Fernandes²; Leticia Lazzarotto²; Amanda Carvalho Ribeiro²; Maria Lúcia Scroferneker^{1,2}

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

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

³Santa Catarina State Agricultural Research and Rural Extension Agency (Epagri), Laboratory of Analysis of Wines and Derivatives, Experimental Station of Videira, Videira, SC, Brazil.

Short title: Chromoblastomycosis: melanin and oxidative stress

Key-words: oxidative stress, hydrogen peroxide, chromoblastomycosis, DHN-melanin, tricyclazole.

Corresponding author: Maria Lúcia Scroferneker, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, sala 325, CEP: 90050-170, Porto Alegre - RS, Brasil. Tel. (+55) 51-33083934 Fax. (+55) 51-33083121 (e-mail: scrofern@ufrgs.br)

SUMMARY

Background: Chromoblastomycosis is a skin fungal infection. These fungal have 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin in their cell wall, which protects against fungal aging by acting as direct oxygen radical scavenger.

Objectives: Evaluate whether melanin confers resistance to the oxidative effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) in chromoblastomycosis agents treated or not with tricyclazole, an inhibitor of DHN-melanin.

Methods: We used 78 isolates distributed in 13 species within five genera. Isolates were treated or not with 16 µg/mL tricyclazole. The percent of survival was obtained after plating a inoculum of spores that were previously exposed to 40 mM hydrogen peroxide (H₂O₂).

Results: Mean survival percentage (standard error) was of 62.9 (2.1) for strains exposed to tricyclazole and of 79.4 (1.7) for melanized strains (paired Student T test; P < 0.05). Significant differences within species were observed for *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecae monophora* and *Phialophora americana*.

Conclusions: Chromoblastomycosis agents with inhibited DHN-melanin were more sensitive to oxidative stress than melanized fungi, indicating that melanin protects conidia from oxidative stress. Moreover, melanized conidial forms of the genus *Rhinocladiella* were more sensitive to H₂O₂ than fungi of the genera *Fonsecaea*, *Cladophialophora* and *Phialophora*. This finding suggests a difference on DHN-melanin within species of the genus *Rhinocladiella*.

INTRODUCTION

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic and progressive cutaneous and subcutaneous infection that is caused by melanized fungi of genera *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Exophiala* and *Rhinocladiella*.¹ A common characteristic shared by the members of this group is the presence of a polymer derived from 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN-melanin), which is found in the vegetative and parasitic cell walls.^{2,3} A specific inhibitor of this type of melanin is 5-methyl-1,2,4-triazol[3,4]benzothiazole (tricyclazole), which has been used in CBM melanin studies *in vitro*.^{4,5} Studies have shown that melanin in *Fonsecaea* spp. protects against aggressive environmental factors such as UV irradiation and extreme pHs.^{6,7} Melanin is also considered an immunologically active compound and an important virulence factor, since in the presence of the pigment fungal cells can activate the complement system of the host⁸ and also avoid phagocytosis⁹, and render the melanized cells more resistant to oxidative burst of macrophages.¹⁰ The protection conferred by melanin against free radicals and other reactive oxygen species is due to the presence of unpaired electrons in its molecule⁵. Two *in vitro* studies evaluating survival of *Fonsecaea* isolates exposed to H₂O₂ have been published in the literature. A significant decrease in survival was observed when *F. pedrosoi* isolates were exposed to tricyclazole, in comparison to non-exposed isolates⁵. Conversely, no difference between albino and melanized *F. monophora* isolates was reported by Sun et al. [7]. In both studies, the number of isolates was low and only *Fonsecaea* was evaluated. Therefore, the aim of this study was to evaluate the protection of melanin against oxidative effects of H₂O₂ in CBM agents treated or not with tricyclazole.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms

Seventy eight clinical isolates of CBM agents obtained from the fungal culture collection of Laboratory of Pathogenic Fungi, Department of Microbiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, were evaluated. The strains were previously identified by molecular sequencing of ITS1-5,8S-ITS2 DNA region.¹¹ The strains were representative of 13 species distributed within five genera of CBM, as follows: *Fonsecaea pedrosoi* (42), *F. monophora* (15), *F. nubica* (1), *F. pugnacius* (1), *Cladophialophora carrionii* (3), *C. bantiana* (1), *Phialophora verrucosa* (2), *P. americana* (5), *Exophiala spinifera* (3), *E. xenobiotica* (2), *Rhinocladiella aquaspersa*

(1), *R. tropicalis* (1) and *R. similis* (1). The strains were inoculated paired in potato dextrose agar (Himedia, Mumbai, India) in the presence or not of 16 µg/mL tricyclazole (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) dissolved previously with ethyl alcohol.⁵ After 14 days at 30 °C, conidial suspensions were prepared by scraping across the surface of the fungal colonies with sterile plastic loops and sterile 1 X phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4. The suspensions were filtered through filter paper to separate hyphae and conidia and the filtrate was washed and resuspended in 500 µL PBS. Inoculum suspensions were adjusted to 2×10^4 conidia/mL by using a Neubauer chamber.

Oxidative stress testing

The concentration of H₂O₂ used in this study was based on earlier published studies^{5,7} and on previous experiments with one strain of the species *F. pedrosoi*, *C. carrionii*, *P. americana*, *E. spinifera* and *R. aquaspersa*. Therefore, the H₂O₂ concentration (40 mM) was based on the concentration that led to a low survival but with at least 25 colonies/plate to decrease the error of the estimate.¹² Similarly, the time of reading (at day 14th of incubation) was chosen according to the minor time that resulted in similar colony counts between intervals.

Inoculum suspensions exposed to 40 mM H₂O₂ were incubated for 1 h at 37 °C with shaking. Aliquots of each strain that were not exposed to oxygen reagent were used as viability controls and were considered 100% of survival for comparison purposes.

After H₂O₂ exposure, suspensions were washed with 1 x PBS, resuspended to the initial volume and diluted 1:10. For colony count, 100 µL were spread onto Sabouraud dextrose agar plates and incubated for 14 days at 30 °C.¹³

Survival percentages of tricyclazole exposed and non-exposed groups were compared by the paired Student T test followed by Tukey post hoc test. Survival percentages among the different genera were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post hoc test. SPSS version 18 was used for all statistical analyses performed, considering $\alpha=0.05$.

RESULTS

Figure 1 shows mean survival percentages of 78 strains of CBM agents previously treated or not with tricyclazole and exposed to 40 mM H₂O₂. When DHN-melanin was inhibited by tricyclazole, CBM agents survived less than when melanin was not

inhibited, with statistical differences observed for *Fonsecaea* spp. and *Phialophora* spp. ($p < 0.05$). Results at species level showed significant statistical differences for *F. pedrosoi*, *F. monophora* and *P. americana* (**Table 1**). When the species were analyzed separately, *F. pedrosoi*, *F. monophora* and *P. americana* were the species that showed statistical difference when the survival means were compared before and after tricyclazole treatment ($*p < 0.05$, **Table 1**).

Survival to oxidative stress in wild-type strains, *i.e.*, non-treated with tricyclazole, differed among the genera studied. Differences (mean \pm SE) were observed when *Rhinocladiella* spp. (51.2 ± 22.0) was compared to *Fonsecaea* (80.5 ± 1.6 , $p = 0.006$), *Cladophialophora* (88.4 ± 7.4 , $p = 0.009$) and *Phialophora* (80.9 ± 5.3 , $p = 0.024$) (**Fig. 1**). No difference among the genera was observed when DHN-melanin was inhibited by tricyclazole treatment ($P > 0.05$).

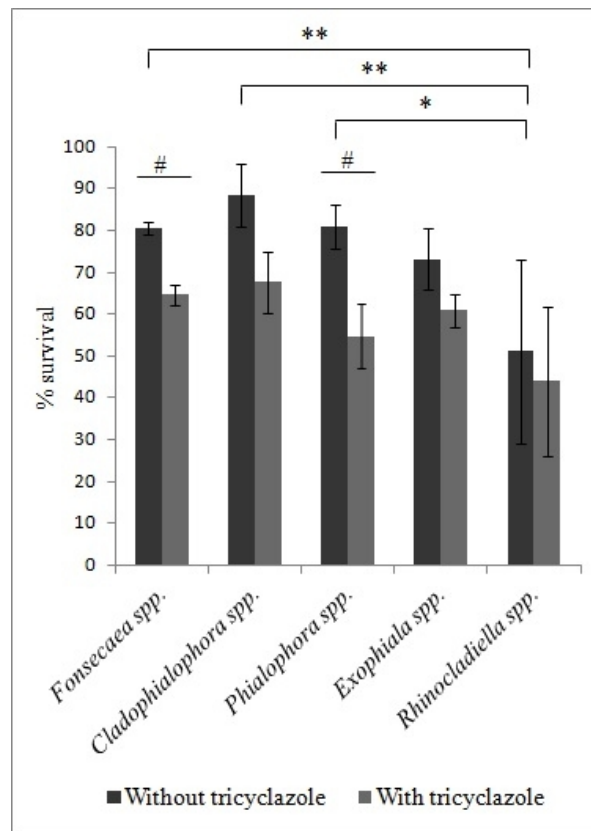


Figure 1. Percent survival of 78 strains of chromoblastomycosis agents of the genera *Fonsecaea* (59), *Cladophialophora* (4), *Phialophora* (7), *Exophiala* (5) and *Rhinocladiella* (3), treated or not with 16 $\mu\text{g/mL}$ tricyclazole and incubated at 37 $^{\circ}\text{C}/1\text{h}$ with 40 mM H_2O_2 .

indicates significant differences between groups treated or not with tricyclazole (paired Student T test; $p < 0.05$). Asterisks denote differences between fungal genera not treated with tricyclazole ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, ANOVA followed by the Tukey test).

Table 1. Percent survival of chromoblastomycosis agents treated or not with 16 µg/mL tricyclazole (TC) and exposed to 40 mM H₂O₂.

Species	n	Mean (SE)		Percent reduction (SE)
		Without TC	With TC	
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	42	79.2 (1.8)	63.6 (2.9)*	19.3 (3.6)
<i>Fonsecaea monophora</i>	15	85.7 (2.5)	68.4 (4.1)*	18.2 (4.8)
<i>Fonsecaea nubica</i>	1	99.5	94.7	4.8
<i>Fonsecaea pugnacius</i>	1	53.5	33.9	36.6
<i>Cladophialophora carrionii</i>	3	84.5 (8.9)	66.6 (10.2)	19.3 (14.7)
<i>Cladophialophora bantiana</i>	1	98.0	70.8	27.8
<i>Phialophora verrucosa</i>	2	81.6 (15)	56.5 (7.2)	26.7 (22.3)
<i>Phialophora americana</i>	5	80.6 (6.1)	54.1 (10.9)*	34.9 (10)
<i>Exophiala spnifera</i>	3	76.5 (12.3)	60.9 (6.7)	18.1 (10.8)
<i>Exophiala xenobiotica</i>	2	68.2 (7.6)	61.0 (5.3)	10.4 (2.2)
<i>Rhinochadiella aquaspersa</i>	1	24.3	23.5	3.3
<i>Rhinochadiella tropicalis</i>	1	34.7	28.8	17
<i>Rhinochadiella similis</i>	1	94.8	79.8	15.8
Total	78	79.4 (1.7)	62.9 (2.1)*	19.9 (2.4)

Asterisk denotes significant differences between groups by the paired Student T test (p<0.05).

DISCUSSION

This is the first study that evaluated oxidative stress in all CBM genera, comparing strains melanized and with DHN-melanin inhibited by tricyclazole treatment. Cunha et al. [5], using one strain of *F. pedrosoi*, showed a reduction of approximately 20% of tricyclazole-treated *F. pedrosoi* growth in comparison to the control after incubation with H₂O₂. This is in line with the results of our study, where the reduction on survival of *F. pedrosoi* exposed to tricyclazole was of 19.3%. Using four *F. monophora* isolates, Sun et al. [7] showed a reduction of about 67% of diameter of albino colonies exposed to 1mM S-nitroso-N-acetylpenicillamine, a nitric oxygen donor agent, when compared to melanized isolates. Therefore, both studies suggest that melanin from these two *Fonsecaea* species plays an important role in the defense against aggressive agents. Here we extend this conclusion to all species of CBM agents tested, mainly for *P. americana*, *F. pedrosoi* and *F. monophora*, which showed significant statistical differences between survival of isolates treated or not with tricyclazole. The lack of statistical differences for the remaining 10 species is likely to be explained by the low number of isolates, which is related to the rarity of these species in Brazil.¹

The inhibition of DHN-melanin biosynthesis using concentrations between 16 and 50 µg/mL of tricyclazole added to the culture medium has been evaluated in studies with *Exophiala dermatitidis* and *Fonsecaea* spp.^{4,6,14} It was verified that tricyclazole, at 16 µg/mL, did not cause alteration in the viability of *F. pedrosoi* cells.⁴ Tricyclazole has also been used in agriculture against phytopathogenic fungi, but its fungitoxicity is low, requiring a concentration of 215.64 µg/mL to inhibit *Magnaporthe oryzae*, the agent of rice blast disease.¹⁵ In this sense, the concentration of tricyclazole used in our study was chosen because its inertia in relation to viability of *F. pedrosoi* cells. The inhibition of the melanin was evidenced in each isolate of this study from reddish brown colonies growth in the medium with tricyclazole.¹⁶ This is explained by the accumulation of scytalone, flaviolin, 3,3'-biflaviolin and 2-hydroxyjuglone, which are pathway metabolites resulted of DHN-melanin inhibition.¹⁴

An important result of the present study is that melanized *Rhinocladiella* isolates were more sensitive to H₂O₂-induced oxidative stress when compared to *Fonsecaea*, *Cladophialophora* and *Phialophora*, the three most common CBM agents.¹ One could hypothesize that the rarity of *Rhinocladiella* infections is due to its increased susceptibility to environment and host stressors/factors such as UV radiation and phagocytosis. Indeed, the results indicate that this high sensitive to oxidative stress could be related to DHN-melanin. When melanin synthesis was inhibited, differences between *Rhinocladiella* and the other genera were not statistical significant, which suggest some difference in quantification or composition of melanin in this genus. Indeed, *R. similis* showed survival percentages similar to the other genera evaluated. Notwithstanding, further studies including a large number of isolates should be performed to confirm this hypothesis.

R. tropicalis and *R. similis* were recently implicated as CBM agents. The first was described as a novel fungal species isolated from CBM patients¹⁷ and the second was isolated for the first time from a patient with CBM in the year of 2000 (M. A. Resende, R. B. Caligiorne, C. R. Aguilar and M. M. Gontijo, Abstr. 14th Congr. Int. Soc. Human Anim. Mycol., p. 274, 2000). A second case of *R. similis* infection is being submitted by our research group.

In relation to *Fonsecaea* genus, some *in vitro* studies using mammalian cells have highlighted the importance of DHN-melanin in phagocytosis escape⁹ and in inhibiting NO production by macrophages.^{18,19} In contrast, a study showed fungal internalization and destruction due to higher concentrations of reactive oxygen species produced by

phagocytes when exogenous melanin was added to the tests.²⁰ Another study showed greater activation of complement proteins, suggesting that melanin serves as an acceptor of these proteins in the cell wall⁸ and would facilitate the attack and elimination of these cells by the immune system.

In conclusion, this study showed that melanized conidial forms of the genus *Rhinocladiella* were more sensitive to H₂O₂-induced oxidative stress than genera *Fonsecaea*, *Cladophialophora* and *Phialophora*, suggesting a difference on composition or quantification of DHN-melanin in genus *Rhinocladiella*, mainly *R. aquaspersa* and *R. tropicalis*. Moreover, a decrease in conidia survival after H₂O₂ exposure was observed when DHN-melanin was inhibited by tricyclazole in the CBM agents *F. pedrosoi*, *F. monophora* and *P. americana*, indicating that melanin protects conidia against oxidative stress.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support and scholarships and Danielle Machado Pagani for her valuable contribution in this work.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Queiroz-Telles F, de Hoog S, Santos DW, et al. Chromoblastomycosis. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(1):233-276. doi: 10.1128/CMR.00032-16.
2. Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2003;5(4):203-223. doi:10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x.
3. Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres-Guerrero H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun.* 2000;68(6):3696-3703. doi:10.1128/IAI.68.6.3696-3703.2000.

4. Franzen AJ, Cunha MM, Batista EJ, Seabra SH, De Souza W, Rozental S. Effects of tricyclazole (5-methyl-1,2,4-triazol[3,4]benzothiazole), a specific DHN-melanin inhibitor, on the morphology of *Fonsecaea pedrosoi* conidia and sclerotic cells. *Microsc Res Tech*. 2006;69(9):729-737. doi: 10.1002/jemt.20344.
5. Cunha MM, Franzen AJ, Seabra SH, et al. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiol*. 2010;10:80. doi: 10.1186/1471-2180-10-80.
6. Li XQ, Guo BL, Cai WY, et al. The role of melanin pathways in extremotolerance and virulence of *Fonsecae* revealed by de novo assembly transcriptomics using illumine paired-end sequencing. *Stud Mycol*. 2016;83:1-18. doi: 10.1016/j.simyco.2016.02.001.
7. Sun J, Zhang J, Najafzadeh MJ, et al. Melanization of a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora* increases tolerance to stress factors while no effects on antifungal susceptibility. *Mycopathologia*. 2011;172(5):373-380. doi: 10.1007/s11046-011-9439-1.
8. Pinto L, Granja LF, Alviano DS, da Silva MH, Alviano CS, Ejzemberg R. Activation of the human complement system by pigmented and hypopigmented mycelia of the fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycoses*. 2011;54(5):e474-480. doi:10.1111/j.1439-0507.2010.01956.x.
9. Farbiarz SR, de Carvalho TU, Alviano C, de Souza W. Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells in vitro. *J Med Vet Mycol*. 1992;30(4):265-273.
10. Rozental S, Alviano CS, de Souza W. The *in vitro* susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. *Mycopathologia*. 1994;126(2):85-91.
11. Daboit TC, Duquia RP, Magagnin CM, et al. A case of *Exophiala spinifera* infection in Southern Brazil: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Med Mycol Case Rep*. 2012;1:72–75. doi: 10.1016/j.mmcr.2012.08.006.
12. Sutton S. Accuracy in plate counts. *J Validation Technol*. 2011; 17(3):42-46.
13. Diezmann S, Dietrich FS. *Saccharomyces cerevisiae*: population divergence and resistance to oxidative stress in clinical, domesticated and wild isolates. *PLoS One*. 2009;(4):e5317. doi: 10.1371/journal.pone.0005317.
14. Wheeler MH, Abramczyk D, Puckhaber LS, et al. New biosynthetic step in the melanin pathway of *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*: evidence for 2-acetyl-1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalene as a novel precursor. *Eukaryot Cell*. 2008;7(10):1699-1711. doi: 10.1128/EC.00179-08.

15. Kunova A, Pizzatti C, Cortesi P. Impact of tricyclazole and azoxystrobin on growth, sporulation and secondary infection of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Pest Manag Sci*. 2013;69(2):278-284. doi: 10.1002/ps.3386.
16. Kogej T, Wheeler MH, Lanisnik RT, Gunde-Cimerman N. Evidence for 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;232(2):203-209. doi:10.1016/S0378-1097(04)00073-4.
17. Gomes RR, Vicente VA, Azevedo CM, et al. Molecular epidemiology of agents of human chromoblastomycosis in Brazil with the description of two novel species. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(11):e0005102. doi: 10.1371/journal.pntd.0005102.
18. Bocca AL, Brito PP, Figueiredo F, Tosta CE. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia*. 2006;161(4):195-203.
19. Zhang J, Wang L, Xi L, et al. Melanin in a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora* inhibits the production of nitric oxide and Th1 cytokines of murine macrophages. *Mycopathologia*. 2013;175(5-6):515-522. doi: 10.1007/s11046-012-9588-x.
20. Alviano DS, Franzen AJ, Travassos LR, et al. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. *Infect Immun*. 2004;72(1):229-237. doi: 10.1128/IAI.72.1.229-237.2004

Artigo submetido para Revista
Medical Mycology
(artigo 5)

Quantification of melanin in chromoblastomycosis agents

Daiane Heidrich 1,2; Valeriano Antonio Corbellini 3; Letícia Lazzarotto 2; Amanda Carvalho Ribeiro 2; Maria Lúcia Scroferneker 1,2

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

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

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

Short title: Quantification of melanin in chromoblastomycosis agents

Key-words: chromoblastomycosis, DHN-melanin, melanin quantification, gravimetry, ultraviolet-visible

Corresponding author: Maria Lúcia Scroferneker, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 sala 325, CEP: 90050-170, Porto Alegre - RS, Brasil. Tel. (+55) 51-33083934 Fax. (+55) 51-33083121 (e-mail: scrofern@ufrgs.br; valer@unisc.br)

ABSTRACT

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic cutaneous and subcutaneous infection caused by five melanized fungi genera (*Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Exophiala* and *Rhinocladiella*). In their cell wall, there is a polymer derived from 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN melanin). Despite the importance of melanin in CBM agents, only one study quantifying melanin of these fungal was performed. Therefore, the aim of this study was to compare the quantification of extractable melanin with NaOH of five genera of CBM agents and confirm the extraction of melanin by evaluation of ultraviolet and visible (UV-VIS) scanning spectrum. The melanin of 63 clinical isolates, representative of 12 species distributed on five genera of CBM, was extracted by NaOH and precipitated by HCl. The qualitative and quantitative analyses were performed by UV-VIS and by gravimetric (percentage of melanin mass extracted from dry fungal mass), respectively. The melanin variation of isolates was from 0.05% to 7.56% (median 1.90%), and the statistical difference showed melanin extraction larger from genus *Fonsecaea* than *Rhinocladiella*, and from *Phialophora* than *Rhinocladiella* and *Exophiala*. In spectra UV-VIS, there was a peak decreasing in different wavelength in each genera, and, in 700-800nm, there was larger absorbance of some genera than others, which can be related to percentage of melanin in fungal mass. The variability of melanin production among isolates confers less melanin protection in some isolates than other, which can be related to larger sensitivity to harmful environmental effects and to host phagocytes.

INTRODUCTION

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic cutaneous and subcutaneous infection caused by melanized fungi of genera *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora*, *Exophiala* and *Rhinocladiella*.¹ In their cell wall, there is a polymer derived from 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN melanin)^{2,3} that can act in protection of these fungal against environmental factors (UV irradiation, extreme pHs)^{4,5} and as a virulence factor, avoiding phagocytosis⁶ and resisting to burst oxidative released by immunological cells⁷. Due to the ability of melanins to solubilize on base and acid precipitation, melanins have been extracted from the fungi with sodium hydroxide (NaOH) and precipitated with hydrochloric acid (HCl), called alkali-acid extraction which has also been used in *Fonsecaea* spp., being preceded by the qualitative and quantitative analyzes in studies of melanins.⁸⁻¹⁰

There are no methods to identify the monomeric units or the total melanin polymer due to limitations of available biochemical and biophysical parameters.⁹ Although the melanin structure is unknown, there are some methods for its qualitative analysis. For CBM agents, the qualitative analysis evaluation was only performed for one strain of *Fonsecaea* sp., including solution capacity in solvents,⁸ electron spin resonance (ESR),⁹ and infrared spectroscopy (IR).⁸ Ultraviolet and visible (UV-VIS) scanning spectrum was not evaluated for chromoblastomycosis agents, but it was performed for other fungal producing DHN-melanin.¹¹ Quantitative analysis of melanin was also performed for only one strain of *Fonsecaea* sp., using melanin mass extracted from a certain fungal mass used for extraction, obtaining percentage ratio of masses.⁸

Therefore, due to presence of only one study in literature evaluating one strain of a genus of CBM agents, the aim of this study was to compare the quantification of extractable melanin with NaOH of five genera of CBM agents and confirm the

extraction of melanin by evaluation of ultraviolet and visible (UV-VIS) scanning spectrum.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms

Sixty three clinical isolates of CBM agents from the fungal culture collection of the Laboratory of Pathogenic Fungi, Department of Microbiology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, were evaluated. Previously, the strains were identified by molecular sequencing of ITS1-5,8S-ITS2 DNA region using primers and amplification conditions used by Daboit et al. [12]. The strains were representative of 12 species distributed on five genera of CBM, as follows: *F. pedrosoi* (32), *F. monophora* (12), *F. pugnacius* (1), *C. carrionii* (3), *C. bantiana* (1), *P. verrucosa* (2), *P. americana* (5), *E. spinifera* (3), *E. xenobiotica* (2), *R. quaspersa* (1), *R. tropicalis* (1), *R. similis* (1).

Fungal mass acquisition

The strains were inoculated in potato dextrose agar (Himedia, Mumbai, India), and after 14 days, at 30 °C, the conidial suspensions were prepared by scraping across the surface of the fungal colonies with sterile plastic loops and 0.85% saline solution. The suspensions were filtered with filter paper to separate hyphae and conidia, being added one mL in erlenmeyer 250mL flask containing 100mL of Sabouraud dextrose broth. For each strain, four flasks were inoculated and incubated for 28 days at 30°C in dark and without shaking. In parallel, purity test with filtered strains was performed.

Fungal biomass was triturated in mortar and pestle, placed into falcons 50mL conical centrifuge tubes and centrifugated at 9500 rpm at 15°C for 20 minutes, using RC 6 Plus Centrifuge (Sorvall-Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). The cells were

rinsed 3 times or until being colorless with sterile distilled water at room temperature. The fungi with minimal water were placed in sterile glass Petri plate and dried at 50°C until complete dry for about two days.

The dry mass of each strain was scraped and 0.1000 (± 0.0010) g of it was put into a 30mL glass flask, closed and maintained away from light until melanin extraction process was over.

Melanin extraction

In each flask, 20mL of 2% sodium hydroxide (NaOH) were added and the extraction was performed by shaking (1500rpm) at 25 °C for 24h, using a KS 4000 shaker ic control (Ika®, Staufen, Germany). The material was centrifuged at 9500 rpm for 15 minutes at 15°C. The supernatant was filtrated using 0.22 μ m cellulose nitrate membrane by vacuum and, of the filtered, one aliquot of 1mL was removed and kept at -30°C away from light for *melanin UV-VIS scanning spectrum*. To the rest of the supernatant, it was added concentrate HCl slowly with gentle stirring until pH 1.⁸ After 1 hour without shaking, the melanin precipitated was collected by centrifugation at 9500 for 15 minutes rpm at 15°C, washed three times with acidified water and suspended with 500 μ L of water pH7.0. The melanin in suspension on water was inserted into a pre-weighed 2 mL microcentrifuge tube, lyophilized for 24h and the microcentrifuge tube was weighed again in order to calculate the weight difference, the melanin mass value which was used to determine the *melanin quantification*.

Melanin quantification

The formula used for quantification of melanin produced by fungi was⁸:

Mass melanin (%) = (lyophilized mass melanin / dry mass fungal) x 100.

To compare each genus and each species in relation to quantification of extractable melanin with NaOH, Kruskal-Wallis tests were performed, one for genera and one for species analyses. SPSS version 18 was used, considering $\alpha=0.05$.

Melanin UV-VIS scanning spectrum

For melanin evaluation of CBM agents by UV-VIS scanning spectrum, the melanin extracted of the median strain of *melanin quantification* of each genus was chosen to represent the genus melanin quantification. The five melanins were diluted 1:3 in 2% NaOH, and the scanning spectrum of 190 to 800nm was obtained against 2% NaOH as blank using quartz cuvette in Anthos Zenyth 200rt Microplate Reader (Biochrom, St. Albans, UK).

RESULTS

Melanin quantification

The percentage of melanin extracted from CBM genera in relation to mass of dry fungal (**Figure 1**) was higher from the genus *Fonsecaea* than *Rhinocladiella* and from *Phialophora* than *Rhinocladiella* and *Exophiala* ($p<0.05$). **Table 1** shows that *F. pedrosoi* had more melanin extracted than *F. monophora* and shows that *P. americana* had more than *F. monophora*, *F. pugnacius*, *E. xenobiotica* and the species of *Rhinocladiella* ($p<0.05$).

Melanin UV-VIS scanning spectrum

In **Figure 2**, it is observed that there was no peak in visible region, but there was a stabilized peak in about 230 nm for the five genera, and this peak decreased in different wavelength by genera *Phialophora* (259nm), *Fonsecaea* (267nm), *Rhinocladiella*

(269nm), *Cladophialophora* (308nm) and *Exophiala* (325nm).

There was larger absorbance in wavelength of some genera than in others, which can be related to results with significant difference in evaluation of percentage melanin in mass, as follows: 190-459 and 700-800 nm, the absorbances of *Fonsecaea* spp. were larger than *Rhinochadiella* spp.; 190-244 and 477-800 nm, the absorbances of *Phialophora* were larger than *Rhinochadiella* spp.; 617-800nm, the absorbances of *Phialophora* spp. were larger than *Exophiala* spp.

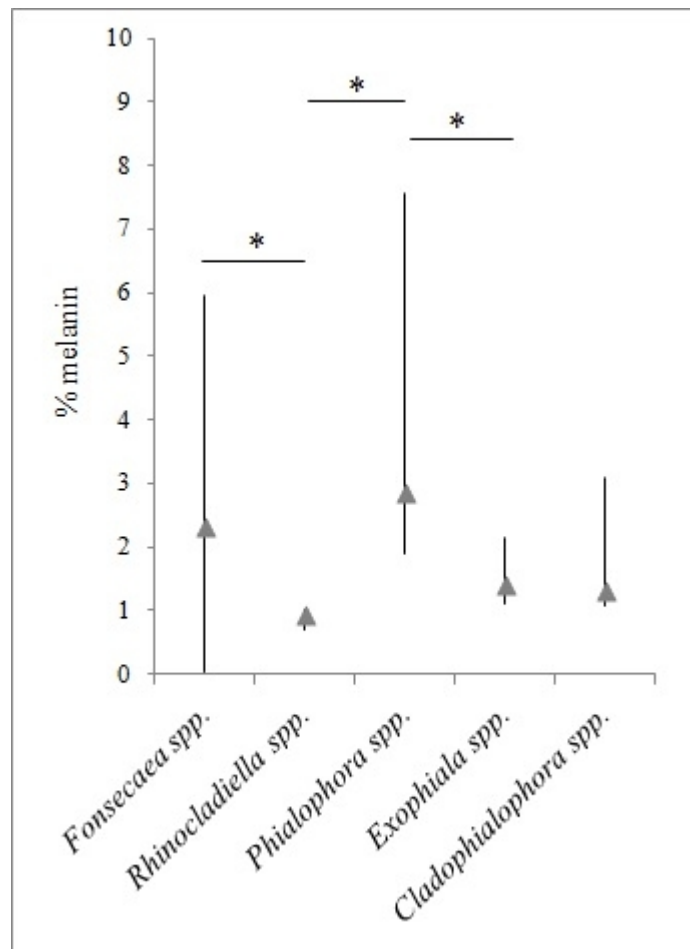


Figure 1. Median (triangle), minimal and maximal (black line) of melanin extracted with 2% NaOH from chromoblastomycosis genera (% of melanin mass).

* $p < 0.05$: significant difference by Kruskal-Wallis statistical test using SPSS version 18.

Table 1. Median (min-max) of melanin extracted with 2% NaOH from chromoblastomycosis agents (% of mass).

Species	n	% Median of melanin (min-max)
<i>Phialophora americana</i>	5	3.81 (1.93-7.56)
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	32	2.48 (0.43-5.96)
<i>Phialophora verrucosa</i>	2	2.06 (1.90-2.21)
<i>Exophiala spnifera</i>	3	1.89 (1.10-2.15)
<i>Fonsecaea monophora</i> */**	12	1.55 (0.05-3.00)
<i>Cladophialophora bantiana</i>	1	1.35
<i>Cladophialophora carrionii</i>	3	1.30 (1.09-3.08)
<i>Exophiala xenobiotica</i> *	2	1.30 (1.19-1.41)
<i>Rhinocladiella tropicalis</i> *	1	1.00
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i> *	1	0.94
<i>Fonsecaea pugnacius</i> *	1	0.93
<i>Rhinocladiella similis</i> *	1	0.69
Total	63	1.90 (0.05-7.56)

* Species with less % melanin than *P. americana*

** Species with less % melanin than *F. pedrosoi*

p<0.05 in Kruskal-Wallis statistical test using SPSS version 18.

% Mass melanin = (melanin mass / fungal mass) x 100

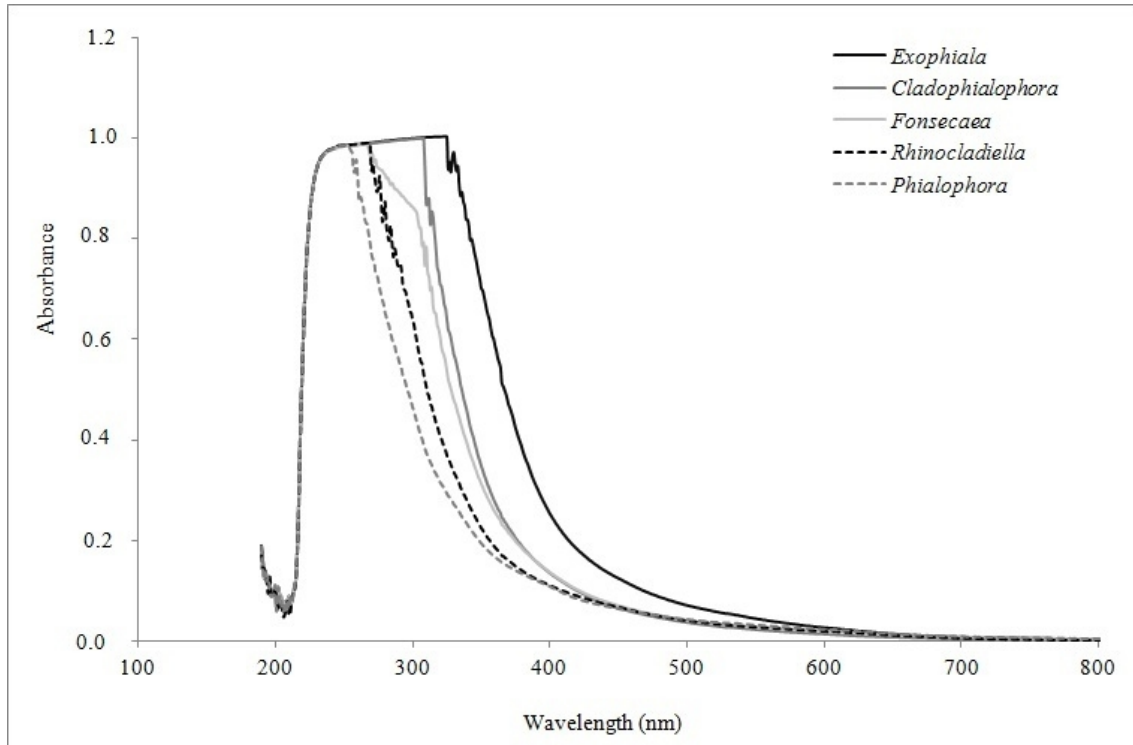


Figure 2. Ultraviolet and visible spectra (190-800nm) of melanin extracted with 2% NaOH of chromoblastomycosis agents genera. In order to represent each genus, a spectrum medium of one strain of each species was performed.

DISCUSSION

Despite the importance of melanin in CBM agents, both as defense in the environment and in the escape of the immune system of the host,⁴⁻⁷ only one study quantifying melanin of these fungal was performed up to now. Alviano et al. [8] extracted melanin using 2% NaOH from one isolate of pigmented *Fonsecaea* sp. with 3 liters of Czapeck-Dox medium for culture, but in a test in this study, medium provided a low fungus growth (data not shown), being an impractical medium for the evaluation of so many samples. Therefore, the medium chosen for culturing strains was the Sabouraud dextrose broth commonly used in clinical laboratory.¹ Using Czapeck-Dox as medium, the ratio of melanin by wet fungal mass was 2.7%⁸, and with Sabouraud dextrose, the ratio was 2.3%, in median, two similar results in percentage, but in the present study, it was used dry fungal mass to enable comparison among samples, since the weight of water interferes in a gravimetric result.¹³ In this sense, these results suggested that melanin of the strain grown in Czapeck-Dox, despite the poor fungal growth could increase production of melanin by fungal in comparison to Sabouraud dextrose, which could be due to the difference of media in nitrogen sources, which has been reported as an important factor in melanin production in other fungal, i.e. *Cryptococcus neoformans*¹⁴ and the edible mushrooms *Auricularia auricular*.¹³ However, the comparison of media and nitrogen sources with the same strain in CBM agents can be important to elucidate the hypothesis.

This study showed that more melanin was extracted by genus *Phialophora* followed by *Fonsecaea*, *Exophiala*, *Cladophialophora* and *Rhinoctadiella*. Among species, *P. americana* was the first rank of melanin production, but with large variability among isolates. This variability is observed in all species being evaluated with three or more isolates, showing that the extractable melanin with NaOH is not homogeneous in the same species and could be a characteristic of each isolate, as it occurs in other

organisms, as in humans.¹⁵ Besides the diversity observed inside the species, there were statistical differences in melanin quantifications among some species due to the high difference observed, such as melanin extracted from a sample of *P. americana*, which was larger than 150 times compared to melanin extracted from *F. monophora* sample, suggesting that *P. americana* is more resistant to harmful environmental factors, as UV and extreme pH,^{4,5} and the immunological system of the host.^{6,7}

Ultraviolet and visible (UV-VIS) scanning spectrum was not evaluated before for CBM agents. However, the declining pattern observed in these agents was also found in melanin extracted of *Paecilomyces variotii*, other DHN melanin producer, with peak in 200nm region.¹¹ The use of commercial standard DOPA melanin to perform a standard curve to infer the quantification of melanin in fungal that is mainly known as a DHN melanin producer, and as it was performed for *Aspergillus terreus* and *Aspergillus tubingensis*,¹⁰ it can lead to calibration bias due the difference between both melanins and the low sensibility in reading at 459nm, since there is no peak in this wavelength for CBM agents. Besides, in 459nm, there is a little difference in absorbance of genera *Fonsecaea* and *Rhinocladiella*, as observed in gravimetric quantification, and it could be useful in comparison in the melanin quantification among these genera. However using for comparison of all genera, wavelengths from 700 to 800nm could be used to propose a model of conversion of the melanin absorbance extracted from 5 mg of dry fungal in 1 mL of 2%NaOH, as used in this study, making easier and faster, requiring less mass of fungal for the analysis, leading to a less cost in culture medium, reagents and other materials. However, in order to propose a model of genera or species, the analysis of melanin of more strains is required.

In conclusion, this study showed that the larger and smaller melanin extracted by 2% NaOH were from genera *Phialophora* and *Rhinocladiella*, respectively, and there was

difference between some species, as *F. pedrosoi* and *F. monophora*. The variability of melanin production among isolates was up to 150 times, conferring less melanin protection in some isolates than other, which can be related to larger sensitivity to harmful environmental effects and to host phagocytes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the financial support and scholarships, and Danielle Machado Pagani for her valuable contribution to this work.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCE

1. Queiroz-Telles F, de Hoog S, Santos DW, et al. Chromoblastomycosis. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30(1): 233-276. doi: 10.1128/CMR.00032-16.
2. Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2003; 5(4): 203-223.
3. Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres- Guerrero H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun.* 2000; 68: 3696-3703. doi: 9-9567/00/\$04.0010.
4. Li XQ, Guo BL, Cai WY, et al. The role of melanin pathways in extremotolerance and virulence of *Fonsecae* revealed by de novo assembly transcriptomics using illu-

- mine paired-end sequencing. *Stud Mycol.* 2016; 83: 1-18. doi: 10.1016/j.simyco.2016.02.001.
5. Sun J, Zhang J, Najafzadeh MJ, et al. Melanization of a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora* increases tolerance to stress factors while no effects on antifungal susceptibility. *Mycopathologia.* 2011; 172(5): 373-380. doi: 10.1007/s11046-011-9439-1.
 6. Farbiarz SR, de Carvalho TU, Alviano C, de Souza W. Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells in vitro. *J Med Vet Mycol.* 1992; 30(4): 265-273.
 7. Rozental S, Alviano CS, de Souza W. The *in vitro* susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. *Mycopathologia.* 1994; 126: 85-91.
 8. Alviano CS, Farbiarz SR, De Souza W, Angluster J, Travassos LR. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *J Gen Microbiol.* 1991; 137(4): 837-844.
 9. Cunha MM, Franzen AJ, Seabra SH, et al. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 80. doi: 10.1186/1471-2180-10-80.
 10. Pal AK, Gajjar DU, Vasavada AR. DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species. *Med Mycol.* 2014; 52(1): 10-18. doi: 10.3109/13693786.2013.826879.
 11. Babitskaia VG, Shcherba VV, Filimonova TV, Grigorchuk EZ. Melanin pigments of the fungi *Paecilomyces variotii* and *Aspergillus carbonarius*. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2000; 36(2): 128-133.
 12. Daboit TC, Duquia RP, Magagnin CM, et al. A case of *Exophiala spinifera* infection in Southern Brazil: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Med Mycol Case Reports.* 2012; 1: 72–75. doi: 10.1016/j.mmcr.2012.08.006.

13. Zhang M, Xiao G, Thring RW, Chen W, Zhou H, Yang H. Production and characterization of melanin by submerged culture of culinary and medicinal fungi *Auricularia auricula*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015; 176(1): 253-266. doi: 10.1007/s12010-015-1571-9.
14. Lee IR, Chow EW, Morrow CA, Djordjevic JT, Fraser JA. Nitrogen metabolite of metabolism metabolism and virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genetics*. 2011; 188(2): 309-323. doi: 10.1534/genetics.111.128538.
15. Murase D, Hachiya A, Fullenkamp R, et al. Variation in Hsp70-1A Expression contributes to skin color diversity. *J Invest Dermatol*. 2016; 136(8): 1681-191. doi: 10.1016/j.jid.2016.03.038.

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação dos setenta e oito isolados utilizados nos experimentos foi obtida pelo sequenciamento da região ITS do rDNA com adição de árvores filogenéticas para diferenciação de *F. pedrosoi* e *F. monophora*. A identificação segue o padrão de prevalência entre as espécies distribuídas na América, sendo *F. pedrosoi* a espécie mais frequente. O baixo número de isolados das outras espécies está realmente relacionado à raridade dos casos.

A partir da identificação destes isolados, foi possível verificar que um caso de CBM por *R. similis* ocorreu no México em 2002, sendo este o primeiro caso de CBM causado por essa espécie que será publicado na literatura. Este relato de caso, apresentado nesta tese, foi publicado na revista *Medical Mycology: case reports* em parceria com a Prof. Dra. Glória Gonzalez, da *Universidad Autónoma de Nuevo León*, do México (**artigo 2**). Outra nova espécie do gênero *Rhinocladiella* também foi identificada como causadora de CBM por nosso grupo de pesquisa, um isolado de *R. tropicalis*, que juntamente com outros três isolados de mesma espécie compõe o artigo intitulado *Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species*, publicado em novembro de 2016 pela revista *PLOS Neglected Tropical Diseases* em parceria com grupos de pesquisa do Paraná, Maranhão, Pará, São Paulo, Amazonas, Mato Grosso e Utrecht (Holanda).

No artigo avaliando os espectros de IV de agentes CBM (**artigo 1**) foi observado que a similaridade entre *F. pedrosoi* e *F. monophora* obtida pelo dendrograma do HCA do FTIR foi equivalente à encontrada na árvore filogenética da região ITS do rDNA, ressaltando a alta relação existente entre estas duas espécies, tanto genotípica, da região do DNA avaliada, quanto dos modos vibracionais das moléculas apresentadas nas células. A análise do IV mostrou diferenças entre as espécies de agentes da CBM relacionadas a bandas de proteínas, polissacarídeos, alguns aminoácidos e nucleotídeos, o que proporcionou o desenvolvimento de um modelo que utiliza os espectros de IV totais dos agentes da CBM e apresentou alta capacidade de classificar as treze espécies. Além disso, neste estudo propomos uma técnica de preparo de fungos filamentosos para avaliação em FTIR-ATR, apresentando um protocolo mais fácil, com baixos riscos de contaminação ambiental e do manipulador, além da possibilidade de aquisição de bons espectros.

O estudo da quantificação de melanina (**artigo 5**) corrobora com os resultados

encontrados de sobrevivência ao estresse (**artigo 4**), as interfaces entre os dois artigos são: (i) o gênero *Rhinocladiella*, quando não está com melanina inibida, mostrou maior sensibilidade ao estresse causado pelo H₂O₂ do que *Phialophora* e *Fonsecaea*. A hipótese levantada, de que a melanina estaria em menor quantidade no gênero *Rhinocladiella* do que nos demais, pôde ser confirmada pela quantificação, já que foi significativamente menor do que *Phialophora* e *Fonsecaea*; (ii) *Phialophora* e *Fonsecaea* obtiveram alta quantidade de melanina extraída e também foram os gêneros que mais sobreviveram após o estresse oxidativo quando a melanina não tinha sido inibida; (iii) *P. americana*, *F. pedrosoi* e *F. monophora* foram às únicas espécies que tiveram redução significativa frente ao estresse oxidativo em comparação da amostra sem e com o inibidor de melanina, mostrando que a inibição da melanina fragilizou o fungo, gerando menor sobrevivência dos isolados com melanina inibida. Estas mesmas espécies foram as listadas no topo do *ranking* de produtoras de melanina, indicando que quando as mesmas apresentavam alta quantidade de melanina, sua resistência ao estresse oxidativo era muito maior do que quando a melanina destas amostras foi inibida.

Avaliando de uma forma mais abrangente, a quantificação de melanina não parece ter correlação com o perfil de suscetibilidade a antifúngicos. Porém, estudo correlacionando os resultados é necessário para confirmação. No entanto, os resultados do **artigo 3** confirmaram que a inibição da melanina DHN pelo triciclazol pode aumentar a suscetibilidade dos agentes CBM ao ITZ, ao PSZ, à TRB e à AMB e que com a inibição da melanina, a diferença entre espécies do mesmo gênero foi aumentada nos testes contra KTZ e VRZ.

Além disso, no **artigo 3** verificamos que TRB foi o antifúngico que apresentou menores CIMs contra gêneros *Fonsecaea*, *Phialophora* e as espécies *R. aquaspersa* e *R. similis*. VRZ ou PSZ apresentaram as CIM mais baixas de *Cladophialophora*, *R. tropicalis* e *F. pugnacious*. AMB e ITZ apresentaram as CIM mais elevadas. O fato de ITZ ter CIMs elevadas é um fato preocupante em virtude deste medicamento ser o padrão para combate à infecção.

Portanto, os achados do último artigo supracitado mostraram a importância da aplicação de métodos moleculares e do teste de suscetibilidade antifúngica nas práticas clínicas. Além disso, os estudos que avaliaram a relação com melanina, tanto quantificação, estresse oxidativo e relação com antifúngicos comprovam, em agentes da CBM, o fator protetor da melanina frente a agressões externas sofridas por

determinados gêneros e espécies, agressões estas relacionadas ao ambiente e ao hospedeiro. Além disso, uma forma de identificação em microbiologia com objetivos de redução de custos e rapidez pode ser alcançada com o uso de ferramentas metabolômicas, como FTIR. Nesta esfera, o presente trabalho contribuiu com a inserção de cinco dos sete gêneros de agentes da CBM nesta ferramenta que pode mudar um laboratório de microbiologia clínica no futuro, além de propor uma forma fácil e com baixos riscos laboratoriais utilizando fungos filamentosos patogênicos.

12 PERSPECTIVAS

Em relação ao presente projeto, visto que alguns materiais e dados podem ser (re)utilizados em outros projetos. Elencamos as seguintes perspectivas:

1. Propor um modelo para avaliação direta do perfil de suscetibilidade dos isolados aos antifúngicos, utilizando os espectros da biomassa e resultados da atividade antifúngica obtidos neste trabalho;
2. Analisar as melaninas extraídas, poderemos analisar diretamente em FTIR para avaliação qualitativa das mesmas e inferir diferenças entre gêneros e/ou espécies;
3. Realizar varredura de UV-VIS das melaninas extraídas para confirmar hipótese levantada de diferenças nas absorbâncias obtidas na região de 700-800, que se correlacionariam com a quantidade de melanina extraída e avaliada por gravimetria;
4. Correlacionar a quantidade de melanina de determinados isolados, por exemplo, isolados com alta e baixa quantidade com resposta frente ao estresse oxidativo e antifúngicos para confirmação das conclusões obtidas por avaliação por espécies, como foi realizada em todo o trabalho.

Esse trabalho contribuiu na implementação de novas linhas de pesquisa no laboratório, como os testes de estresse oxidativo e utilização de FTIR para avaliação de fungos, e também oportunizou parcerias importantes com outros grupos de pesquisa, visando o compartilhamento de conhecimento e de estrutura laboratorial para novos projetos.

13 ANEXOS

3.1 Comprovante de submissão à Revista *Mycoses*

Melanin confers protection against oxidative stress in chromoblastomycosis agents

(artigo 4)

Assunto:	Mycoses - Manuscript ID MYC-OA-2017-099
De:	Mycoses (onbehalfof+MYCedoffice+wiley.com@manuscriptcentral.com)
Para:	scroferm@ufrgs.br;
Cc:	daiane.heidrich@yahoo.com.br; smendesbr@gmail.com; regnitro@yahoo.com.br; elissa.kfernandes@yahoo.com.br; letti.lazzarotto@gmail.com; amandacarvalho@icloud.com; scroferm@ufrgs.br;
Data:	Terça-feira, 11 de Abril de 2017 8:28

11-Apr-2017

Dear Professor Scroferneker:

Your manuscript entitled "Melanin confers protection against oxidative stress in chromoblastomycosis agents" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the *Mycoses*.

Your manuscript ID is MYC-OA-2017-099.

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

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

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

Thank you for submitting your manuscript to the *Mycoses*.

Sincerely,
Mycoses Editorial Office

3.2 Comprovante de submissão à Revista Medical Mycology

Quantification of melanin in chromoblastomycosis agents

(artigo 5)

Assunto:	Manuscript has been submitted - MM-2017-0103
De:	Medical Mycology (onbehalf+mm.editorialoffice+oup.com@manuscriptcentral.com)
Para:	daiane.heidrich@yahoo.com.br; valer@unisc.br; leti.lazzarotto@gmail.com; amandacarvalhor@icloud.com; scroferm@ufrgs.br;
Data:	Segunda-feira, 17 de Abril de 2017 15:41

17-Apr-2017

Dear Heidrich, Daiane; Corbellini, Valeriano A; Lazzarotto, Leticia; Ribeiro, Amanda Carvalho; Scroferneker, Maria Lúcia

You have been listed as a co-author on a manuscript submitted to Medical Mycology. The manuscript title is "Quantification of melanin in chromoblastomycosis agents". If you were not involved in the production of this manuscript, please contact the editorial office at mm.editorialoffice@oup.com. Alternatively, if you are a co-author on this paper you do not have to take any further action.

Thank you for your attention to this matter.

Sincerely,

Editor-in-Chief
Medical Mycology