

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade De Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

VIVIANE PAGNUSSAT

**SUSCEPTIBILIDADE DE AGENTES DE FEOHIFOMICOSE SUPERFICIAL
AOS ANTIFÚNGICOS**

Porto Alegre, dezembro de 2017

VIVIANE PAGNUSSAT

**SUSCEPTIBILIDADE DE AGENTES DE FEOHIFOMICOSE SUPERFICIAL
AOS ANTIFÚNGICOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado para a obtenção do grau de farmacêutico (a) no Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Coorientadora: Ma. Gabriella da Rosa Monte Machado

Porto Alegre, dezembro de 2017.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

Foi preciso muito esforço, determinação e paciência para chegar até aqui, e nada disso eu conseguiria sozinha. A todos que de forma direta ou indireta, me apoiaram e incentivaram, dedico meus agradecimentos.

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido a oportunidade de realizar mais um sonho e ter me mantido firme nessa caminhada.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela excelência em ensino e a todos os professores que acompanharam minha jornada enquanto estudante e foram essenciais à minha formação como profissional e minha evolução como pessoa.

Ao meu orientador Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria, meus mais profundos agradecimentos pela oportunidade, dedicação, confiança, amizade e por seu empenho. Obrigada por ser esse exemplo profissional!

A coorientadora e amiga Gabriella da Rosa Monte Machado, pelas suas inúmeras correções e ensinamentos. Meu eterno agradecimento a ti, por todo carinho, incentivo, paciência e dedicação que teve comigo durante a elaboração desse trabalho.

A todos integrantes do Laboratório de Micologia Aplicada, pelos ensinamentos.

A banca examinadora deste trabalho, Daiane e Osmar, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições.

Aos meus amigos que me auxiliaram nesta jornada e por todos momentos de alegria que me proporcionaram. Em especial a Andressa, Camila e Karina pelo apoio, palavras de força no momento de desânimo, pela alegria de todas as manhãs e principalmente por conquistarem este sonho junto comigo.

Aos meus irmãos, Elisandro e Lisiane, que sempre me fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente. Obrigada por sempre estarem dispostos a estender a mão e pelo companheirismo, cumplicidade, apoio e amor. Vocês são os maiores exemplos na minha vida e com certeza fazem parte dessa vitória!

Finalmente aos meus pais, Claci e Sérgio, meu alicerce e orgulho. Obrigada por cada palavra de incentivo, pelas orações e torcida, pelo apoio incondicional e principalmente por todos os valores repassados que tornaram a pessoa que sou hoje. Obrigada por compreenderem a minha ausência e estarem sempre ao meu lado. Devo tudo a vocês, e se cheguei até aqui é porque tinha vocês segurando minha mão. A vocês, dedico todas as minhas vitórias, alegrias e a minha eterna gratidão.

APRESENTAÇÃO

O presente artigo foi elaborado segundo as normas da Revista Associação Médica Brasileira, descritas em anexo e, contendo os seguintes tópicos: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micologia Aplicada, situado no anexo II da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO.....	1
RESUMO.....	2
SUMMARY.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. MATERIAS E MÉTODOS.....	6
3. RESULTADOS.....	7
4. DISCUSSÃO.....	8
5. CONCLUSÃO.....	9
6. AGRADECIMENTOS.....	10
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
TABELA.....	17
ANEXOS.....	18

**SUSCEPTIBILIDADE DE AGENTES DE FEOHIFOMICOSE SUPERFICIAL
AOS ANTIFÚNGICOS**

**ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY OF AGENTS OF SUPERFICIAL
PHAEOHYPHOMYCOSIS**

Viviane Pagnussat¹, Gabriella da Rosa Monte Machado¹, Janaína Scarton², Alexandre Meneghello Fuentefria¹

¹Laboratório de Micologia Aplicada, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Rua São Luís, 160 – Santana, 9160-091, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Laboratório Mont’Serrat, Rua Mostardeiro, 333 - Loja 112 - Moinhos de Vento, 90430-001, Porto Alegre - RS, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a eficácia terapêutica dos principais antifúngicos utilizados atualmente na clínica médica frente a isolados de *Curvularia* spp. e *Hortaea werneckii* oriundos de casos de feohifomicose superficial.

Métodos: Nove isolados de fungos demáceos foram testados: *C. lunata* (n = 5), *C. pallescens* (n = 1) e *H. werneckii* (n = 3). O perfil de susceptibilidade desses isolados foi avaliado frente à anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC), itraconazol (ITC), terbinafina (TRB) e voriconazol (VRC), através da técnica de microdiluição em caldo. Todos isolados foram cultivados em Ágar Batata Dextrose e incubados a 32°C por 5-7 dias. A metodologia seguiu o documento M38 – A2 (CLSI, 2008).

Resultados: A TRB apresentou maior eficácia frente a *C. lunata* (GM = 0,38 µg/mL) e *H. werneckii* (GM = 0,031 µg/mL), quando comparada aos demais antifúngicos testados. A maioria das espécies demonstrou sensibilidade frente ao ITC e ao VRC ($1 \geq \text{CIM} \leq 8,0$ e $0,5 \geq \text{CIM} \leq 2,0$ µg/mL), respectivamente. Os isolados de *Curvularia* spp. apresentaram sensibilidade satisfatória frente à AMB ($0,5 \geq \text{CIM} \leq 4$ µg/mL). Porém, para alguns isolados de *H. werneckii* esse fármaco foi pouco eficaz (CIM > 64 µg/mL). Todos isolados testados apresentaram baixa sensibilidade ao FLC ($4 \geq \text{CIM} \leq 16$ µg/mL).

Conclusão: Os resultados demonstraram variações quanto ao perfil de susceptibilidade entre as espécies fúngicas frente aos antifúngicos testados. A TRB apresentou-se como uma ótima alternativa para o tratamento de feohifomicoses superficiais. Assim, os testes de susceptibilidade antifúngica são essenciais para indicar a escolha da terapêutica ideal frente a essas infecções.

Palavras-chave: Fungos demáceos, feohifomicoses superficiais, susceptibilidade antifúngica, *Curvularia* spp., *Hortaea werneckii*.

SUMMARY/ABSTRACT:

Objective: To evaluate the therapeutic efficacy of the main antifungal agents currently used in medical practice in relation to *Curvularia* spp. and *Hortaea werneckii* from cases of superficial phaeohyphomycosis.

Methods: Nine isolates of dematiaceous fungi were tested: *C. lunata* (n = 5), *C. pallescens* (n = 1) and *H. werneckii* (n = 3). The susceptibility profile of these isolates was evaluated against amphotericin B (AMB), fluconazole (FLC), itraconazole (ITC), terbinafine (TRB) and voriconazole (VRC) by the broth microdilution technique. All isolates were grown in Potato Dextrose Agar and incubated at 32°C for 5-7 days. The methodology followed the document M38 - A2 (CLSI, 2008).

Results: TRB showed greater efficacy against *C. lunata* (GM = 0.38 µg/mL) and *H. werneckii* (GM = 0.031 µg/mL) when compared to the other antifungals tested. The most species showed sensitivity to ITC and VRC ($1 \geq \text{MIC} \leq 8.0$ and $0.5 \geq \text{MIC} \leq 2.0$ µg/mL), respectively. The isolates of *Curvularia* spp. presented satisfactory sensitivity to AMB ($\text{MIC} \geq 0.5$ $\text{MIC} \leq 4$ µg/mL). However, for some isolates of *H. werneckii*, this drug was not very effective ($\text{MIC} > 64$ µg/mL). All isolates tested showed low sensitivity to FLC ($4 \geq \text{MIC} \leq 16$ µg/mL).

Conclusions: The results showed variations regarding the susceptibility profile among fungal species when compared to the antifungals tested. The TRB has been showed to be a great alternative for the treatment of superficial phaeohyphomycosis. Thus, antifungal susceptibility tests are essential to indicate the choice of ideal therapy against these infections.

Keywords: Dematiaceous fungi, superficial phaeohyphomycosis, antifungal, susceptibility, *Curvularia* spp., *Hortaea werneckii*.

1. INTRODUÇÃO

Fungos filamentosos demáceos geralmente são encontrados em ambientes úmidos, tais como vegetação em decomposição, ninhos de pássaros, madeira e solo, abrangendo regiões de climas tropicais e subtropicais.¹ Esses organismos caracterizam-se morfológicamente pela formação de colônias escuras, hifas septadas ou elementos de levedura com paredes escuras.² A pigmentação dos fungos demáceos está associada à presença de melanina na parede celular dos mesmos, a qual atua como um importante fator de virulência no desenvolvimento de infecções fúngicas em humanos, como, por exemplo, as feohifomicoses.³

Feohifomicoses ungueais são exemplos de onicomicoses não-dermatofíticas⁴ responsáveis por 1,5 a 18% dos casos de infecções fúngicas.⁵ Essas micoses têm apresentado aumento na sua incidência em humanos, manifestando-se não somente em pacientes imunocomprometidos, mas, também, em indivíduos imunocompetentes.⁶ A lesão decorrente de uma feohifomicose é caracterizada por alterações na arquitetura das unhas, como mudanças na coloração, espessura, descolamento e onicodistrofia das mesmas.⁷ Existem mais de cem espécies fúngicas associadas a essas infecções, incluindo principalmente os gêneros *Alternaria*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Exophiala* e *Scedosporium*.²

O gênero *Curvularia* apresenta abrangência mundial com cerca de oitenta espécies relatadas, das quais a maioria é encontrada no solo e em plantas.² Devido a isso, grande parte dos casos de infecções causadas por esses fungos são em homens de 30 a 50 anos que trabalham em zonas rurais, carpintaria ou outras ocupações que os expõem aos materiais vegetais.^{8,9}

Tinea nigra é uma feohifomicose superficial causada pelo agente infeccioso, atualmente chamado, *Hortaea werneckii*.¹⁰ Em 1921, este fungo foi isolado dessas infecções e denominado *Cladosporium werneckii* e, posteriormente, *Exophiala werneckii* e *Phaeoannellomyces werneckii*.¹¹ As lesões características da infecção são em formato de máculas marrons a pretas, com margens afiadas e formas irregulares, geralmente localizadas nas palmas das mãos e plantas dos pés.¹² Crianças, adultos jovens e indivíduos com hiperidrose nas mãos e nos pés são os grupos mais acometidos por essa feohifomicose.^{13,14}

H. werneckii é um micro-organismo de distribuição mundial, principalmente encontrados em regiões de climas tropicais e subtropicais da América Central e do Sul, África e Ásia¹³ e em locais com alta concentração de sal, como oceanos.¹¹ Essa espécie possui características estruturais peculiares, pois a sua forma leveduriforme e filamentosa coexistem simultaneamente. Inicialmente, suas colônias são restritas, pretas e semelhantes à levedura (yeast-like fungi).¹⁵ Ao longo do tempo, essas estruturas tornam-se hifas largas, septadas e escuras, com aparência majoritariamente filamentosa.¹⁶

O tratamento de infecções demáceas pode ser realizado com diferentes classes de agentes antifúngicos.¹⁷ Os azóis itraconazol (ITC), voriconazol (VRC) e posaconazol (PSC), são considerados os fármacos de primeira escolha e os mais eficazes para o tratamento de feohifomicoses.^{1,16,18} Segundo Wong (2016), a anfotericina B (AMB) geralmente possui atividade satisfatória frente à maioria dos fungos demáceos.¹⁹ Alguns estudos demonstram que a terbinafina (TRB) apresenta alta eficácia contra essas infecções.^{18,20} Por outro lado, fluconazol (FLC) e cetoconazol (CTC) são pouco ativos frente às feohifomicoses.^{1,19} Especificamente para o gênero *Curvularia*, o tratamento de escolha para as feohifomicoses ainda não está bem estabelecido. Segundo Aguas (2017) o uso de AMB, miconazol (MCZ), CTC, TRB e ITC apresenta resultados satisfatórios.²¹ Em paralelo, estudos demonstram que a terapia com ITC e TRB tem sido eficaz em casos de *Tinea nigra* causada por *H. werneckii*.^{14,22}

Atualmente, a seleção de isolados fúngicos resistentes à terapia clínica disponível, juntamente com o aumento do número de pacientes imunocomprometidos, tem colaborado para o aumento da incidência de infecções fúngicas.²³ Cunha (2013), relata casos de resistência ao ITC e VRC para algumas espécies de *Curvularia* sp., tais como: *C. aerea*, *C. borrieriae*, *C. protuberata* e *C. pseudorobusta*.²⁴ Segundo Revankar (2010) baixa sensibilidade à AMB é demonstrada em algumas espécies de *Curvularia* sp.

A avaliação da susceptibilidade antifúngica tem se tornado cada vez mais relevante no cenário clínico. Visto que, tal fato possibilita a descoberta de novos isolados clínicos resistentes à terapia disponível.²⁵ Entretanto, estudos avaliando a susceptibilidade antifúngica frente a fungos demáceos causadores de feohifomicoses, são raros. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia terapêutica dos principais antifúngicos utilizados atualmente na clínica médica frente a isolados de coleção de

cultura de *Curvularia* spp. e de *Hortaea werneckii* oriundos de casos de feohifomicose superficial.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Isolados fúngicos

Um total de nove isolados de fungos demáceos foram utilizados neste estudo: *Curvularia lunata* (CLU 01, CLU 02, CLU 03, CLU 04 e CLU 05), *Curvularia pallescens* (CPA 01) e *H. werneckii* (HWE 01, HWE 02 e HWE 03). Os organismos estão depositados na micoteca do Laboratório de Micologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil) e foram cedidos para este estudo. A cepa *Candida albicans* ATCC 18804 foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC) e utilizada como controle. As espécies fúngicas foram confirmadas de acordo com as chaves taxonômicas de Ellis (1971), Sivanesan (1987) e Lima (2007).^{26,27,28}

2.2. Antifúngicos

Anfotericina B (AMB) (Cristália, São Paulo, Brasil), fluconazol (FLC) (Sigma, St. Louis, MO), itraconazol (ITC) (Pfizer, Nova York, NY), terbinafina (TRB) (Cristália, São Paulo, Brasil) e voriconazol (VRC) (Pfizer, Nova York, NY) foram utilizados neste estudo. As soluções antifúngicas foram preparadas em caldo RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO) em 128 µg/mL (AMB, FLC e ITC), e 16 µg/mL (VRC e TRB), respectivamente.

2.3. Avaliação da Susceptibilidade Antifúngica

O perfil de susceptibilidade antifúngica frente aos isolados de *Curvularia* spp. e *H. werneckii* foi avaliado através da técnica de microdiluição em caldo. Todos isolados foram cultivados em Ágar Batata Dextrose (Kasvi, Paraná, Brasil) e incubados a 32°C por 5-7 dias. Solução salina estéril 0,85% foi utilizada para a dissolução e remoção das colônias fúngicas. As suspensões resultantes contendo os inóculos fúngicos foram homogeneizadas em Vortex e decantadas por 5 min. Logo, os sobrenadantes foram removidos e a concentração de cada inóculo determinada em espectrofotômetro (GT7220, Global Trade Technology) em 530 nm. A densidade óptica de cada inóculo

variou entre 0,09 a 0,13 para *H. werneckii* e 0,25 a 0,3 para *Curvularia* sp. Assim, as concentrações finais das suspensões fúngicas variaram de 0,4 a 5×10^4 UFC/mL.

A microdiluição em caldo foi realizada e as microplacas incubadas a 32°C durante 48 h e 5 dias, para os isolados de *Curvularia* sp. e *H. werneckii*, respectivamente. A CIM foi definida como a menor concentração de antifúngico capaz de inibir 50 (FLC e ITC), 80 (TRB) e 100% (AMB e VRC) de crescimento fúngico quando comparada ao controle de crescimento. A metodologia seguiu o proposto pelo documento M38 – A2.²⁹ Para a cepa de *C. albicans* ATCC 18804 a metodologia seguiu o estabelecido pelo documento M27 - A3³⁰, com interpretação dos *breakpoints* conforme a atualização M27-S4.³¹

3. RESULTADOS

Um total de nove isolados foram identificados quanto ao gênero e espécie a partir da micoteca do Laboratório de Micologia Aplicada (Porto Alegre, Brasil). *C. lunata* (n=5), *C. pallescens* (n=1) e *H. werneckii* (n=3), associados à feohifomicoses superficiais. Os isolados de *C. lunata* apresentaram conídios isolados com três septos, a terceira célula a partir da base maior, elipsoides, septos simples e células das extremidades castanhas claras a sub-hialinas. Os isolados de *C. pallescens* apresentaram conídios isolados, quase todos com três septos, alguns com quatro septos, elipsoides a fusiformes, coloração sub-hialina a castanho clara, com a terceira célula desproporcionalmente maior. Os isolados de *H. werneckii* apresentaram hifas largas, septadas e escuras. Os conídios eram de aspecto elipsoidal, castanhos e com duplo septo central escurecido.

A avaliação da susceptibilidade antifúngica *in vitro* apresentou variação de CIM entre os fármacos. A TRB apresentou maior eficácia frente a *C. lunata* (GM = 0,38 µg/mL) e *H. werneckii* (GM = 0,031 µg/mL), quando comparada aos demais antifúngicos testados. O ITC foi ativo frente a todas espécies analisadas ($1 \geq \text{CIM} \leq 8$). VRC e AMB apresentaram atividade satisfatória frente às espécies de *Curvularia* sp. Porém, para alguns isolados de *H. werneckii*, esses fármacos foram pouco eficazes: VRC (CIM = 8 µg/mL) e AMB (CIM > 64 µg/mL). Todos isolados testados apresentaram baixa sensibilidade ao FLC ($4 \geq \text{CIM} \leq 16$ µg/mL).

Para o gênero *Curvularia*, a susceptibilidade das espécies testadas frente aos antifúngicos foi semelhante. Para *C. lunata*, FLC foi o antifúngico menos ativo (GM =

10,56 µg/mL), seguido por ITC (GM = 2,64 µg/mL), AMB (GM = 1,52 µg/mL), VRC (GM = 1,15 µg/mL) e TRB (GM = 0,38 µg/mL), a qual foi o fármaco mais eficaz. Para *C. pallescens*, FLC apresentou menor eficácia (CIM = 8 µg/mL), seguido por ITC (CIM = 4 µg/mL), AMB e VRC (CIM = 0,5 µg/mL) e TRB (CIM = 0,125 µg/mL). Em contraste, AMB (GM = 32 µg/mL) foi o fármaco menos efetivo frente aos isolados de *H. Werneckii* seguido por FLC (GM= 8 µg/mL), ITC (GM= 2 µg/mL), VRC (GM = 1,26 µg/mL) e TRB (GM = 0,031 µg/mL). Resultados estão detalhadamente expressos na Tabela 1.

4. DISCUSSÃO

Os critérios interpretativos para avaliação da CIM de antifúngicos comerciais frente a fungos filamentosos demáceos não estão devidamente estabelecidos. Tal fato decorre da inexistência de *breakpoints* clínicos definidos para esses fármacos quando avaliados na presença dessas espécies fúngicas (M38 - A2 /CLSI, 2008). Entretanto, os testes de susceptibilidade antifúngica são fundamentais para a identificação de isolados resistentes e para a indicação de um tratamento clínico adequado contra as feohifomicoses superficiais.³² O tratamento dessas micoses irá depender da gravidade e do sítio inicial da infecção, juntamente com fatores do hospedeiro, como doenças crônicas, imunocomprometimento e idade.³³

Para o fluconazol, grande parte dos isolados de fungos filamentosos não foram suscetíveis.^{29,34,35} Dados anteriores indicam que CIM > 8 µg/mL para o ITC sugere uma possível seleção de espécies não-dermatofíticas resistentes a esse fármaco.³⁶ Segundo Yew (2014), frente à AMB, ITC e VRC, os fungos demáceos apresentam alta susceptibilidade, quando CIM ≤ 1 µg/mL e baixa sensibilidade quando CIM ≥ 4 µg/mL.

Neste estudo, as espécies testadas de *Curvularia* sp. demonstraram sensibilidade frente ao ITC e ao VRC. Esses dados vão de encontro com relatos anteriores, onde esses fármacos mostram-se mais eficazes (0,004 ≥ CIM ≤ 2 µg/mL) frente às mesmas espécies fúngicas.^{16,18,37,38,39} Entretanto, Cunha (2013) observa casos de baixa sensibilidade para algumas espécies de *Curvularia* sp. quando avaliadas frente ao ITC e ao VRC.

Estudos recentes demonstram que a AMB vem sendo uma boa alternativa para a escolha de um tratamento contra as feohifomicoses (CIM < 2 µg/mL).^{19,24,32,40} Esses

dados corroboram com nossos resultados. Visto que, os isolados de *Curvularia* spp. apresentaram sensibilidade satisfatória frente à AMB. Entretanto, relatos indicam que a AMB tem apresentado baixa eficácia frente a espécies de *Curvularia* sp.¹⁶

Krizsán (2015) e Nizam (2016) relatam valores de CIM > 8 µg/mL para a TRB quando avaliada frente ao gênero *Curvularia*. Ao contrário, nossos resultados demonstraram que a TRB foi altamente eficaz frente a todos isolados desse gênero. Diversos estudos comprovam a baixa eficácia do FLC para o tratamento de infecções causadas por feohifomicetos (CIM >16 µg/mL).^{24,32,35,37} Da mesma maneira, o presente estudo relatou altos valores de CIM para esse fármaco quando avaliado frente ao gênero *Curvularia*.

Para os isolados de *H. werneckii*, ITC e VTC mostraram-se efetivos. Porém, VTC apresentou CIM elevada frente a alguns isolados testados. Até o momento, essa espécie fúngica não havia apresentado valores de CIM elevados (CIM > 8 µg/mL) frente a esse fármaco.^{41,42} Todos os isolados de *H. werneckii* demonstraram baixa sensibilidade à AMB. Nossos resultados são relevantes e compatíveis aos encontrados por Formoso (2015), o qual relata altos valores de CIM para este fármaco, quando avaliado frente à *H. werneckii*. Os três isolados de *H. werneckii* apresentaram baixa susceptibilidade ao FLC. Formoso (2015) também relata casos de baixa sensibilidade a esse fármaco frente a essa espécie. A TRB também mostrou-se altamente eficaz frente a todos os isolados de *H. werneckii*.

5. CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo avaliando a susceptibilidade aos antifúngicos utilizados na clínica médica de potenciais agentes da feohifomicose. O perfil de susceptibilidade antifúngica apresentou variações frente aos diferentes gêneros de fungos demáceos. Os isolados de *Curvularia* sp. apresentaram maior sensibilidade à terapia disponível quando comparados aos isolados de *H. werneckii*. Apesar de o ITC ser considerado o fármaco de primeira escolha, a TRB apresentou-se como uma ótima opção para o tratamento dessas micoses. Assim, a avaliação da eficácia de antifúngicos utilizados atualmente contra as feohifomicoses superficiais é essencial para indicar o tratamento ideal frente a essas infecções.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório Mont'Serrat pelos insumos prestados para o desenvolvimento do presente estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Isa-Isa R, García C., Isa M, Arenas R. Subcutaneous phaeohyphomycosis (mycotic cyst). *Clin Dermatol.* 2012;30:425-431.
2. Bay C, González T, Muñoz G, Legarraga P, Vizcaya C, Abarca K. Feohifomicosis nasal por *Curvularia spicifera* en un paciente pediátrico con neutropenia y leucemia mieloide aguda. *Rev Chilena Infectol.* 2017;34:280-286.
3. Shrivastava A, Tadepalli K, Goel G, Gupta K, Kumar GP. Melanized fungus as an Epidural abscess: A diagnostic and therapeutic challenge. *Med Mycol Case Rep.* 2017;16:20-24.
4. Fraenza LB, Druetta SV, Raga AJ, Aguada LL, Zalazar V, Farfalli L. Onicomycosis por *Curvularia lunata* var. *aeria*: presentación de un caso clínico. *Rev Argent Microbiol.* 2015;47:54-56.
5. Di Chiacchio N, Noriega LF, Di Chiacchio NG, Ocampo-Garza J. Superficial black onychomycosis due to *Neoscytalidium dimidiatum*. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31:e453–e455.
6. Chen WT, Tu ME, Sun PL. Superficial Phaeohyphomycosis Caused by *Aureobasidium melanogenum* Mimicking Tinea Nigra in an Immunocompetent Patient and Review of Published Reports. *Mycopathologia.* 2016;181:555-560.
7. Shweta B, Archana A, Nupur G. An unusual case of onychomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. *Apollo Medicine.* 2014;11:300-302.
8. Pilar EFS. Feo-hifomicose no Rio Grande do Sul. Apresentação de série de casos e comentários sobre o tema em nosso meio [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

9. 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;49:225-236.
10. Veasey JV, de Avila RB, Ferreira MAM de O, Lazzarini R. Reflectance confocal microscopy of tinea nigra: comparing images with dermoscopy and mycological examination results. *An Bras Dermatol.* 2017;92:568-569.
11. Falcão EM, Trope BM, Martins NR, Barreiros Mda G, Ramos-E-Silva M. Bilateral Tinea Nigra Plantaris with Good Response to Isoconazole Cream: A Case Report. *Case Rep Dermatol.* 2015;7:306-10.
12. Nazzaro G, Ponziani A, Cavicchini S. Tinea nigra: A diagnostic pitfall. *J Am Acad Dermatol.* 2016;75:e219-e220.
13. Brandt ME, Warnock DW. Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. *J Chemother.* 2003;15:36-47.
14. Bonifaz A, Gómez-Daza F, Paredes V, Ponce RM. Tinea versicolor, tinea nigra, white piedra, and black piedra. *Clin Dermatol.* 2010;28:140-145.
15. Ferreira AW, Moraes SL. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes. 3^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2013.p.395.
16. Revankar SG, Sutton DA. Melanized fungi in human disease. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:884–928.
17. Perusquía-Ortiz AM, Vázquez-González D, Bonifaz A. Opportunistic filamentous mycoses: aspergillosis, mucormycosis, phaeohyphomycosis and hyalohyphomycosis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2012;10:611-621.

18. Biancalana FSC, Lyra L, Moretti ML, Schreiber AZ. Susceptibility testing of terbinafine alone and in combination with amphotericin B, itraconazole, or voriconazole against conidia and hyphae of dematiaceous molds. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;71:378–385.
19. Wong EH, Revankar SG. Dematiaceous molds. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30:165–178.
20. Andrade TS, Castro LG, Nunes RS, Gimenes VM, Cury AE. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses*. 2004;47:216-221.
21. Aguas Y, Hincapie M, Fernández-Ibáñez P, Polo-López MI. Solar photocatalytic disinfection of agricultural pathogenic fungi (*Curvularia* sp.) in real urban wastewater. *Sci Total Environ*. 2017;1213–1224.
22. Shannon PL, Ramos-Caro FA, Cosgrove BF, Flowers FP. Treatment of tinea nigra with terbinafine. *Cutis*. 1999; 64:199-201.
23. Rangel LP, Moreira OC, Livramento GN, Britto C, Alviano DS, Alviano CS, et al. Putative role of an ABC transporter in *Fonsecaea pedrosoi* multidrug resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 40:409-415.
24. Da Cunha KC, Sutton DA, Fothergill AW, Gené J, Cano J, Madrid H, et al. In vitro antifungal susceptibility and molecular identity of 99 clinical isolates of the opportunistic fungal genus *Curvularia*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;76:168-174.
25. Toukabri N, Corpologno S, Bougnoux ME, El Euch D, Sadfi-Zouaoui N, Simonetti G. (Resultados não publicados). In vitro biofilms and antifungal susceptibility of dermatophyte and non-dermatophyte moulds involved in foot mycosis. *Mycoses*, 2017.

26. Ellis MB. Dematiaceous Hyphomycetes. England. Commonwealth Mycological Institute; 1971.
27. Sivanesan A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. Mycological Papers. 1987;158: 1-261.
28. Lima, A., M. Furtado. Espécies do género *Curvularia* (Fungos anamórficos: Hyphomycetes) na Ilha de Santiago, Cabo Verde. Portugaliae Acta Biol. 2007;22:145-156.
29. CLSI M38-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard-second edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.
30. CLSI M27-A3. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of 304 Yeasts. Third Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.
31. CLSI M27-S4. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: fourth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.
32. Halliday CL, Chen SC, Kidd SE, van Hal S, Chapman B, Heath CH, et al. Antifungal susceptibilities of non-Aspergillus filamentous fungi causing invasive infection in Australia: support for current antifungal guideline recommendations. Int J Antimicrob Agents. 2016;48:453-458.
33. Araujo R, Oliveira M, Amorim A, Sampaio-Maia B. Unpredictable susceptibility of emerging clinical moulds to tri-azoles: review of the literature and upcoming challenges for mould identification. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015;34:1289-1301.

34. Badali H, de Hoog GS, Curfs-Breuker I, Klaassen CHW, Meis JF. Use of amplified fragment length polymorphism to identify 42 clinical *Cladophialophora* spp., related to cerebral phaeohyphomycosis with *in vitro* antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2350-2356.
35. Yew SM, Chan CL, Lee KW, Na SL, Tan R, Hoh CC, et al. A five-year survey of dematiaceous fungi in a tropical hospital reveals potential opportunistic species. *PLoS One.* 2014;9:e104352.
36. Fleck R, Hof H. Breakpoints for posaconazole susceptibility testing: background and discussion about the need of establishing values. *Mycoses.* 2008;51:1-4.
37. Guarro J, Akiti T, Horta RA, Morizot Leite-Filho LA, Gené J, Ferreira-Gomes S, et al. Mycotic keratitis due to *Curvularia senegalensis* and *in vitro* antifungal susceptibilities of *Curvularia* spp. *J Clin Microbiol.* 1999;37:4170-4173.
38. Shobana CS, Mythili A, Homa M, Galgóczy L, Priya R, Babu Singh YR, et al. *In vitro* susceptibility of filamentous fungi from mycotic keratitis to azole drugs. *J Mycol Med.* 2015;25:44-49.
39. Nizam TM, AG. Binting RA, Saari SM, Kumar TV, Muhammad M, Satim H, et al. *In Vitro* Antifungal Activities against Moulds Isolated from Dermatological Specimens. *Malays J Med Sci.* 2016; 23: 32–39.
40. Krizsán K, Tóth E, Nagy LG, Galgóczy L, Manikandan P, Chandrasekaran M, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility of *Curvularia australiensis*, *C. hawaiiensis* and *C. spicifera* isolated from human eye infections. *Mycoses.* 2015;58:603-609.
41. Formoso A, Heidrich D, Felix CR, Tenório AC, Leite BR, Pagani DM, et al. Enzymatic Activity and Susceptibility to Antifungal Agents of Brazilian Environmental Isolates of *Hortaea werneckii*. *Mycopathologia.* 2015;180:345-352.

42. Ng KP, Soo-Hoo TS, Na SL, Tay ST, Hamimah H, Lim PC, et al. The mycological and molecular study of *Hortaea werneckii* isolated from blood and splenic abscess. *Mycopathologia*. 2005;159:495-500.

Tabela

Tabela 1. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de antifúngicos comerciais frente a isolados de *Curvularia* spp. e *Hortaea werneckii*.

Isolados (número testado)	Antifúngico	Intervalo de CIM	Média Geométrica
		($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
<i>Curvularia lunata</i> (5)	AMB	0,5 - 4	1,52
	FLC	4 - 16	10,56
	ITC	1 - 8	2,64
	TRB	0,125 - 1	0,38
	VRC	0,5 - 2	1,15
<i>Curvularia pallescens</i> (1)	AMB	0,5	-
	FLC	8	-
	ITC	4	-
	TRB	0,125	-
	VRC	0,5	-
<i>Hortaea werneckii</i> (3)	AMB	16 a > 64	32
	FLC	8	8
	ITC	1 - 4	2
	TRB	0,015 - 0,062	0,031
	VRC	0,25 a > 8	1,26

CIM: concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$);

AMB: anfotericina B; FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; TRB: terbinafina; VRC: voriconazol;

Concentração testada para cada antifúngico: 128 $\mu\text{g/mL}$ (AMB, FLC e ITC) e 16 $\mu\text{g/mL}$ (VRC e TRB).

Isolados fúngicos: *Curvularia lunata* (CLU 01, CLU 02, CLU 03, CLU 04 e CLU 05); *Curvularia pallescens* (CPA 01); *H. werneckii* (HWE 01, HWE 02 e HWE 03).

ANEXOS

Regras para publicação na Revista da Associação Médica Brasileira

Normas para Publicação

Objetivo e Política Editorial

A Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB), editada pela Associação Médica Brasileira, tem por objetivo publicar artigos que contribuam para o conhecimento médico. A RAMB é indexada nas bases de dados SciELO, Science Citation Index Expanded (SCIE), Scopus, Web of Science, Institute for Scientific Information (ISI), Index Copernicus, LILACS, MEDLINE e CAPES – QUALIS B2. Atualmente, a revista é produzida apenas na versão on-line de livre acesso (www.ramb.org.br) e os artigos são publicados na língua inglesa.

A RAMB aceita para publicação artigos nas seguintes categorias: Artigos Originais, Artigos de Revisão, Correspondências, Ponto de Vista, Panorama Internacional, À Beira do Leito e Imagem em Medicina. A submissão dos artigos é totalmente gratuita, sem cobrança de qualquer taxa aos seus autores. O Conselho Editorial recomenda fortemente que os autores leiam a versão on-line da RAMB e analisem os artigos já publicados como modelo para a elaboração de seus trabalhos.

Informações gerais

– Como submeter artigos

Os artigos e correspondências deverão ser enviados somente via internet pelo seguinte endereço eletrônico: www.ramb.org.br. Basta a realização de um cadastro, seguido do envio do manuscrito, obedecendo as normas aqui descritas. Só serão aceitos artigos que, dentre seus autores, contenha, no mínimo, um médico.

Os artigos poderão ser escritos em português, espanhol ou na língua inglesa, mas serão publicados na versão em inglês. Cada artigo, acompanhado de correspondência ao editor, deverá conter título, nome completo do(s) autor(es), instituição na qual o trabalho foi realizado e seção da revista à qual se destina.

O conteúdo do material enviado para publicação na RAMB não pode estar em processo de avaliação, já ter sido publicado, nem ser submetido posteriormente para publicação em outros periódicos. A critério do editor chefe, todos os artigos recebidos são revisados por membros do Conselho Editorial.

Ao preparar o manuscrito, os autores deverão indicar qual ou quais áreas editoriais estão relacionadas ao artigo, para que este possa ser encaminhado para análise editorial específica.

O Conselho Editorial recomenda que os autores façam uma busca por artigos relacionados ao tema e publicados anteriormente na RAMB ou em outros periódicos indexados no SciELO, utilizando as mesmas palavras-chaves do artigo proposto. Estes artigos devem ser considerados pelos autores na elaboração do manuscrito com o objetivo de estimular o intercâmbio científico entre os periódicos SciELO.

– O que acontece depois que o artigo foi submetido?

Em virtude do grande número de artigos enviados, o Conselho Editorial adotou critérios de seleção para o processo de revisão por pares. A exemplo do que acontece com outros periódicos, a maior parte dos artigos submetidos não passa para a fase detalhada de avaliação que é a revisão por pares. Os critérios que o Conselho Editorial adotou para essa seleção inicial incluem o perfil editorial da revista e de seus leitores, área de interesse do tema principal do trabalho, título e resumo adequados, redação bem elaborada, metodologia bem definida e correta (incluindo, no caso de estudos clínicos, tamanho amostral, metodologia estatística e aprovação por Comitê de Ética), resultados apresentados de maneira clara e conclusões baseadas nos dados. Esse procedimento tem por objetivo reduzir o tempo de resposta e não prejudicar os autores. A resposta detalhada, elaborada pelos revisores, só ocorre quando o artigo passa dessa primeira fase.

No caso de rejeição, a decisão sobre a primeira fase de avaliação é comunicada aos autores em média duas a três semanas depois do início do processo (que começa logo após a aprovação do formato pelo revisor de forma). O resultado da revisão por pares contendo a aceitação ou a rejeição do artigo para publicação ocorrerá no menor prazo possível.

Embora existam rigorosos limites de tempo para a revisão por pares, a maioria dos periódicos científicos conta com o notável esforço e a colaboração da comunidade científica que, por ter muitas outras atribuições, nem sempre consegue cumprir os prazos. Ao receber o parecer dos revisores, os autores deverão encaminhar, em comunicado à parte, todos os pontos alterados do artigo que foram solicitados pelos revisores. Além disso, o texto contendo as alterações solicitadas pelos revisores deverá ser reencaminhado à RAMB na cor vermelha, devendo ser mantido e sublinhado o texto anterior.

A ordem de publicação dos artigos será cronológica, podendo, no entanto, haver exceções definidas pelo Conselho Editorial. Os trabalhos aceitos para publicação serão enviados aos autores e deverão ser revisados e devolvidos no prazo de dois dias, caso contrário o artigo será publicado em sua forma original. Após a aprovação final pelos autores NÃO será possível modificar o texto.

– Corpo editorial

O Corpo Editorial da RAMB é composto pelo Editor Geral, Editores Associados, Editores Colaboradores e Conselho Editorial nas seguintes áreas: Clínica Médica, Clínica Cirúrgica, Saúde Pública, Pediatria, Ginecologia e Obstetrícia, Bioética, Cancerologia, Emergência e Medicina Intensiva, Medicina Farmacêutica e Medicina Baseada em Evidências. O Corpo Editorial será responsável pela revisão e aceitação ou não dos artigos enviados à revista para publicação. O editor chefe tem as prerrogativas que o cargo lhe confere para aceitar ou não qualquer artigo, independentemente da revisão por pares, assim como definir a edição de sua publicação.

– Estilo e preparação de originais

O trabalho deverá ser redigido em corpo 12, no máximo em 15 laudas de 30 linhas cada, espaço 1,5 linha, com margem de 3 cm de cada lado, no topo e no pé de cada página. Todas as páginas, excluída a do título, devem ser numeradas.

– Página título

Deverá conter:

- a) O título do trabalho, também na versão em inglês, deverá ser conciso e não exceder 75 toques ou uma linha.
- b) Nome, sobrenome do autor e instituição a qual pertence o autor.
- c) Nome e endereço da instituição onde o trabalho foi realizado.
- d) Carta de apresentação, contendo assinatura de todos os autores, responsabilizando-se pelo conteúdo do trabalho, porém apenas um deve ser indicado como responsável pela troca de correspondência. Deve conter telefone, fax, e-mail e endereço para contato.
- e) Aspectos éticos: carta dos autores revelando eventuais conflitos de interesse (profissionais, financeiros e benefícios diretos ou indiretos) que possam influenciar ou ter influenciado os resultados da pesquisa ou o conteúdo do trabalho. Na carta deve constar ainda, quando cabível, a data da aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição à qual estão vinculados os autores. É absolutamente obrigatório o envio, juntamente com o artigo, do termo de copyright, disponível no site da Ramb, devidamente assinado pelos autores, sem o qual o artigo não seguirá o seu fluxo normal de avaliação.

– Tópicos dos artigos

Os artigos originais deverão conter, obrigatoriamente, Introdução, Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

– Notas de rodapé

Apenas quando estritamente necessárias; devem ser assinaladas no texto e apresentadas em folha separada após a do resumo, com o subtítulo “Nota de rodapé”.

– Agradecimentos

Apenas a quem colabore de modo significativo na realização do trabalho. Deve vir antes das referências bibliográficas.

– Resumo/Summary

O resumo, com no máximo 250 palavras, deverá conter objetivo, métodos, resultados e conclusões. Após o resumo deverão ser indicados, no máximo, seis Unitermos (recomenda-se o vocabulário controlado do DeCS – Descritores em Ciências da Saúde,

publicação da BIREME – Centro Latino Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde). Para os termos em inglês recomenda-se o MeSH da base Medline. O Summary visa permitir a perfeita compreensão do artigo. Apresentar em folha separada e seguir o mesmo modelo do resumo: background, methods, results, conclusions. Deve ser seguido de keywords.

Artigos escritos em português devem conter, na segunda página, dois resumos: um em português e outro em inglês (Summary). Artigos escritos em espanhol devem apresentar resumos em inglês (Summary) e português. Os escritos em inglês devem conter resumo também em português.

– Referências bibliográficas

As referências bibliográficas devem ser dispostas por ordem de entrada no texto e numeradas consecutivamente, sendo obrigatória sua citação. Devem ser citados todos os autores, totalizando seis; acima deste número, citam-se os seis primeiros seguidos de et al. O periódico deverá ter seu nome abreviado de acordo com a LIST OF JOURNALS INDEXED IN INDEX MEDICUS do ano corrente, disponível também on-line nos sites: www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html ou www.nlm.nih.gov/citingmedicine ou, se não for possível, a Associação de Normas Técnicas (ABNT). Exemplos:

1. *Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. Br J Cancer 1996;73:1006-12.*
2. Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med 1996;124:980-3.*
3. The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust 1996; 164-282-4.*
4. Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J 1994;84:15.*
5. Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995.p.465-78.
6. Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis [serial on line] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5];1(1):[24 screens]*. Available from: URL: www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm.

7. Leite DP. Padrão de prescrição para pacientes pediátricos hospitalizados: uma abordagem farmacoepidemiológica [dissertação]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

Referências de “resultados não publicados” e “comunicação pessoal” devem aparecer, entre parênteses, seguindo o(s) nome(s) individual (is) no texto. Exemplo: Oliveira AC, Silva PA e Garden LC (resultados não publicados). O autor deve obter permissão para usar “comunicação pessoal”.

– Citações bibliográficas

As citações bibliográficas no texto devem ser numeradas com algarismos arábicos sobrescritos, na ordem em que aparecem no texto. Exemplo: Até em situações de normoglicemia ⁶.

– Figuras, tabelas, gráficos, anexos

No original deverão estar inseridos tabelas, fotografias, gráficos, figuras ou anexos. Devem ser apresentados apenas quando necessários, para a efetiva compreensão do texto e dos dados, totalizando no MÁXIMO TRÊS.

- a) As figuras, sempre em preto e branco, devem ser originais e de boa qualidade. As letras e símbolos devem estar na legenda.
- b) As legendas das figuras e tabelas devem permitir sua perfeita compreensão, independente do texto.
- c) As tabelas, com título e legenda, deverão estar em arquivos individuais.
- d) É preciso indicar, em cada figura, o nome do primeiro autor e o número da figura. Figuras e tabelas deverão ser numeradas separadamente, usando algarismo arábico, na ordem em que aparecem no texto.

– Abreviações / Nomenclatura

O uso de abreviações deve ser mínimo. Quando expressões extensas precisam ser repetidas, recomenda-se que suas iniciais maiúsculas as substituam após a primeira menção. Esta deve ser seguida das iniciais entre parênteses. Todas as abreviações em tabelas e figuras devem ser definidas nas respectivas legendas. Apenas o nome genérico do medicamento utilizado deve ser citado no trabalho.

– Terminologia

Visando o emprego de termos oficiais dos trabalhos publicados, a RAMB adota a Terminologia Anatômica Oficial Universal, aprovada pela Federação Internacional de Associações de Anatomistas (FIAA). As indicações bibliográficas para consulta são as seguintes: FCAT – IFAA (1998) – International Anatomical Terminology – Stuttgart – Alemanha – Georg Thieme Verlag , Editora Manole.