

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde- CCBS
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado

NATÁLIA NUNES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *in vitro* DO ÁCIDO TRANEXÂMICO E DA
HIDROQUINONA COMO ADJUVANTES EM ISOLADOS CLÍNICOS DE
CROMOBLASTOMICOSE CAUSADA POR *Fonsecaea pedrosoi***

São Luís

2025

NATÁLIA NUNES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *in vitro* DO ÁCIDO TRANEXÂMICO E DA
HIDROQUINONA COMO ADJUVANTES EM ISOLADOS CLÍNICOS DE
CROMOBLASTOMICOSE CAUSADA POR *Fonsecaea pedrosoi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. **Conceição de
Maria Pedrozo e Silva de Azevedo**

São Luís

2025

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Nunes, Natália.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *in vitro* DO ÁCIDO TRANEXÂMICO E DA HIDROQUINONA COMO ADJUVANTES EM ISOLADOS CLÍNICOS DE CROMOBLASTOMICOSE CAUSADA POR *Fonsecaea pedrosoi* / Natália Nunes. - 2025.

98 f.

Orientador(a): Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2025.

1. Cromoblastomicose. 2. *Fonsecaea Pedrosoi*. 3. Melanina. 4. Hidroquinona. 5. Tratamento. I. Pedrozo e Silva de Azevedo, Conceição de Maria. II. Título.

NATÁLIA NUNES

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO ÁCIDO TRANEXÂMICO E DA
HIDROQUINONA COMO ADJUVANTES NO TRATAMENTO DA
CROMOBLASTOMICOSE CAUSADA POR *Fonsecaea pedrosoi***

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências da
Saúde da Universidade Federal do
Maranhão, como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutora
em Ciências da Saúde.

Apresentada em / /

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de
Azevedo - UFMA

Examinador: Prof. Dr. Daniel Wagner Castro de Lima Santos –
Externo à UFMA

Examinadora: Prof^a Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva –
Docente PPGSAD/ UFMA

Examinadora: Prof^a. Dra. Vanda Maria Ferreira Simões –
PPGCS/ UFMA

Examinador: Prof. Dr. Antonio Augusto de Moura Silva -
PPGSC/UGMA

Epígrafe

*“O médico que só sabe medicina, nem medicina sabe”
Abel Salazar*

Dedico

*Aos meus pais, Salete e Zé, que cedo me ensinaram que o único caminho
que tínhamos era estudar.*

*Ao meu filho, Marcelo, para que possas te inspirar. Tu és o melhor de mim.
E o melhor que te deixo vem da Educação que recebi.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Conceição por inspirar gerações. Por acolher. Pela professora. Pela médica. Pela mãe. Pela mulher. Obrigada por inspirar em tantas dimensões. Obrigada pela generosidade de me acolher e orientar nesses quase 12 anos - grudada no seu pé (risos). As palavras não alcançam tua altura. Não dimensionam tua trajetória.

À minha irmã. Com quem dividi a barriga da nossa mãe. Com quem divido cada conquista. Que mesmo durante toda a tragédia das enchentes em Porto Alegre e no RS, se dedicou a me ajudar com este doutorado e esta infindável revisão. Ela, já doutora há 10 anos. Obrigada por dividir teu conhecimento. Obrigada por me ajudar a crescer sempre.

Ao Prof. Rodrigo Holanda, que em meio às preocupações da gestação da sua esposa, prof^a Juliana, abriu as portas do seu laboratório, me “emprestou” uma IC (Jeane), me cedeu sua mestranda (Rayssa) – ambas me introduziram no mundo experimental/ laboratório e me ensinaram o pouco sei. O prof. Rodrigo, além do cuidado com o meu conhecimento, se preocupou constantemente com a minha chegada com 28 semanas de gestação dentro de um laboratório de microbiologia, mexendo em produtos e cepa clínica. Mais do que eu, é verdade.

Prof. Dr. Cleydson Breno, que lá no Amapá acreditou no meu trabalho e teve muita paciência no início do processo para que eu pudesse compreender as dimensões possíveis do trabalho para construção do *in silico*. E seu orientando, o, em breve, também dr. Aderaldo por estar tão disponível sempre e por “viajar” comigo nas possibilidades da bioinformática com proteínas que não existem e fármacos que precisam ser testados. Obrigada Aderaldo.

À Carmem, que me adotou na disciplina de Seminários III e, com a maior naturalidade do mundo, encara o laboratório e acha solução para tudo. Meu título, quando vier, também será um pouco teu. Obrigada pela paciência nos testes e tantas contaminações e telhados que caem, hehe. E ao prof. Valério que me cedeu a Carmem e seu laboratório tão rápido quanto à solicitação que lhe fiz.

Profa. Sirlei, que desde sempre faz sementeiras, culturas e testes como se escrevesse com uma caneta. E na parceria, cedeu as amostras de *F. pedrosoi* deste estudo.

À UFMA, que tem acolhido e feito crescer essa gaúcha. Tantos professores que encontrei na minha trajetória. Tantas mulheres que sustentam a ciência nesse país. Eu tive o prazer de ter algumas na minha formação e me orgulho de tê-las encontrado. Em especial, ao PPGCS, na figura da profa. Rachel que acolhe com carinho e cuidado cada aluno deste programa.

À medicina, de onde vem mais do que sustento. Vem dimensões de mundos e seres humanos. Vem uma possibilidade de ser luz onde estou. És bela, mas tão exigente! Obrigada pacientes, que os chamo de “meus”, por assim entender a responsabilidade do que faço.

Meu marido Gabriel. O “rei do Excel”; perdeu sono arrumando tabelas infundáveis e desorganizadas. Que tantas vezes não soube o motivo de uma esposa, mãe, mulher, estudante estar estressada, mas que acolheu e apoiou sempre. É bom ter ao lado nessa caminhada. Te amo.

Minha mãe, minha incansável lutadora, por ensinar desde sempre que o único caminho é a educação. Por mostrar que é possível ser muitas coisas ao mesmo tempo e não perder a empatia e o olhar pelo outro. Que esse país precisa que nos dediquemos a ele para que cresça um pouco mais igualitário.

Meu pai, meu velho, por me ensinar que às vezes a gente sai um pouquinho da “confusão” e quando volta, o cérebro funciona melhor. E que sempre é possível encontrar uma solução. Sempre é possível consertar.

Meu filho. Ah, meu filho. Tu não tens noção de quanta transformação promoveu em mim. Por ti, tantas coisas valem a pena. Obrigada por chegar na minha vida. Ainda acho que foste tu a melhor produção do meu doutorado (risos). Mamãe ama gigante!

À Deus. Que força Tu tens. Como Tu tens sido bom comigo! Como Tens me abençoado neste caminho! Obrigada.

RESUMO

A Cromoblastomicose (CBM), micose subcutânea crônica causada por fungos melanizados, como *Fonsecaea pedrosoi*, foi incluída, em 2017, no rol das Doenças Tropicais Negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), destacando a necessidade de avanços no diagnóstico e tratamento. Atualmente o tratamento de escolha é o itraconazol (ITR), embora a resposta ainda seja limitada, mesmo quando associado a outros fármacos ou terapias. A melanina, componente importante da parede celular do *F. pedrosoi*, está associada à maior virulência e resistência aos tratamentos. A via de síntese da melanina humana e fúngica é bastante semelhante. Nesse sentido, esse estudo, avaliou, *in vitro*, o efeito da hidroquinona (HQN) e do ácido tranexâmico (ATX), agentes despigmentantes utilizados no tratamento do melasma, em dois isolados clínicos de *Fonsecaea pedrosoi* FpJW e FpBR, isoladamente e em associação ao ITR. Além disso, investigou-se, *in silico*, a interação molecular do ATX em comparação com HQN e Ácido Kójico (KOJ) com alvos da via da melanina, por meio de dockagem molecular. Determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) dos fármacos por microdiluição em caldo, com leitura visual. A interação entre ITR e HQN foi avaliada pelo método Tabuleiro de Xadrez. A CIM do ITR foi de 2µg/mL, para FpJW e 0,5µg/mL para FpBR. Além disso, a HQN demonstrou efeito citotóxico e fungicida com CIM e CFM iguais a 780µg/mL para ambos os isolados, mesmo não sendo um antifúngico clássico. A associação HQN + ITR resultou em efeito aditivo, com redução de até 50% da CIM da HQN e de até 1/32 da CIM do ITR para FpJW e 1/16 para FpBR, evidenciando pela primeira vez o efeito da HQN sobre a espécie fúngica e tornando possível seu uso como adjuvante em tratamento do CBM. Além disso, por se tratar de um fármaco tópico e por ter apresentado efeito fungicida, em casos específicos como os de pacientes hepatopatas, com restrição de uso de terapias sistêmicas, torna-se uma possibilidade de tratamento isolado. Sugere-se, ainda, que ao associar HQN ao ITR seja possível reduzir o tempo de tratamento da doença, incluindo possível reposicionamento do fármaco. A análise *in silico* demonstrou que o ATX interage com alvos da melanogênese com padrão de ligação semelhante aos da HQN e do KOJ, sugerindo possível ação inibitória da melanina, dando suporte à manutenção do uso desse fármaco como opção terapêutica no melasma, pois sugere fortemente que há ação direta na síntese da melanina, fato ainda pouco elucidado na literatura. Este é o primeiro estudo conhecido a demonstrar, *in vitro*, o potencial da hidroquinona como adjuvante no tratamento da Cromoblastomicose. A HQN, por ser de uso tópico, baixo custo e segurança já estabelecida, surge como uma alternativa promissora. Os resultados inovadores ampliam o horizonte terapêutico da CBM e reforçam a importância do reposicionamento de fármacos em doenças negligenciadas. Além disso, é o primeiro estudo a comparar *in silico* a ação do ATX ao KOJ e HQN e demonstrar ação direta na via de síntese da melanina, elucidando os efeitos clínicos já amplamente relatados na literatura.

Palavras-chave: Cromoblastomicose; *Fonsecaea pedrosoi*; Melanina; Melanogênese; Tratamento antifúngico; Hidroquinona; Ácido Tranexâmico; *in vitro*; *in silico*.

ABSTRACT

Chromoblastomycosis (CBM), a chronic subcutaneous mycosis caused by melanized fungi such as *Fonsecaea pedrosoi*, was included in 2017 in the list of Neglected Tropical Diseases by the World Health Organization (WHO), highlighting the urgent need for advances in diagnosis and treatment. Currently, the drug of choice is itraconazole (ITR), although therapeutic response remains limited, even when combined with other drugs or treatment modalities. Melanin, a key component of the *F. pedrosoi* cell wall, is associated with increased virulence and resistance to antifungal therapy. Notably, the melanin biosynthesis pathway in humans and fungi is highly conserved. In this context, the present study evaluated, *in vitro*, the effect of hydroquinone (HQN) and tranexamic acid (ATX)—depigmenting agents commonly used in the treatment of melasma—on two clinical isolates of *F. pedrosoi* (FpJW and FpBR), both individually and in combination with ITR. Furthermore, *in silico* molecular docking analysis was conducted to assess the interaction of ATX with targets in the melanin synthesis pathway, compared to HQN and kojic acid (KOJ). Minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum fungicidal concentrations (MFCs) of the compounds were determined by broth microdilution with visual inspection. The interaction between ITR and HQN was evaluated using the Checkerboard assay. The MIC of ITR was 2 µg/mL for FpJW and 0.5 µg/mL for FpBR. HQN, although not a conventional antifungal, exhibited cytotoxic and fungicidal activity with MIC and MFC values of 780 µg/mL for both isolates. The combination of HQN and ITR produced an additive effect, with a 50% reduction in HQN MIC and a reduction in ITR MIC of up to 1/32 for FpJW and 1/16 for FpBR. These findings provide the first evidence of HQN activity against *F. pedrosoi*, supporting its potential use as an adjuvant in the treatment of CBM. Additionally, due to its topical route of administration and demonstrated fungicidal activity, HQN may be considered as a standalone treatment in specific clinical scenarios, such as in patients with hepatic impairment where systemic therapies are contraindicated. The combination therapy may also reduce treatment duration, further supporting the potential drug repurposing of HQN for CBM. An *in silico* analysis revealed that ATX interacts with melanogenesis targets in a binding pattern like that of HQN and KOJ, suggesting direct inhibitory activity on melanin biosynthesis. These findings support the continued therapeutic use of ATX in melasma and contribute to a better understanding of its molecular mechanism, which remains underexplored in literature. To the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate the *in vitro* potential of hydroquinone as an adjuvant in the treatment of chromoblastomycosis. Given its topical use, low cost, and well-established safety profile, HQN emerges as a promising therapeutic alternative. These innovative findings expand the therapeutic landscape for CBM and underscore the importance of drug repurposing in the context of neglected diseases. Moreover, this is the first study to compare the *in silico* activity of ATX with that of KOJ and HQN, demonstrating a direct action on the melanin biosynthetic pathway and providing new insights into its widely reported clinical effects.

Keywords: Chromoblastomycosis; *Fonsecaea pedrosoi*; Melanin; Melanogenesis; Antifungal therapy; Hydroquinone; Tranexamic acid; *in vitro*; *in silico*.

LISTA DE ABREVIações

ALA-PDT – Ácido 5- aminolevulínico

AMP-B – Anfotericina B

ATX – Ácido Tranexâmico

BRCast - Comitê Brasileiro de Teste de sensibilidade antimicrobiana

CBM - Cromoblastomicose

CEM – Concentração Efetiva Mínima

CEP/UFMA - Comitê de ética em Pesquisa/ Universidade Federal do Maranhão

CID-10/11 - Classificação Internacional de Doenças

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute

CREDIP/UFMA - Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias/ Universidade Federal do Maranhão

DHN- Diidroxinaftaleno

DMSO - Dimetilsulfóxido

DOPA – Diidroxifenilalanina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ECV – Epidemiological cut-off value (ponto de corte epidemiológico)

EUCast- Comitê Europeu de Teste de sensibilidade antimicrobiana

HE - Hematoxilina- eosina

HQN - Hiquinona

ICIF – Índice de Concentração Inibitória Fracionada

ISHAM – International Society for Human & Animal Mycology

ITR - Itraconazol

ITS – Espaador Interno Transcrito

KOH - Hidróxido de Potássio

KOJ - Ácido Kójico

MALDI-TOF - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight

MOPS - Ácido Morfolino Propano Sulfônico

NIBA - Núcleo de Imunologia Básica Aplicada

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

PDA – Ágar Batata Dextrose

PDB - Protein Data Bank

PPGCS - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

RNA – Ácido Ribonucleico

SDA – Ágar Sabourad dextrose

TCZ - Triciclazol

TRB – Terbinafina

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFMA – Universidade Federal do Maranhão

UNIFAP - Universidade Federal do Amapá

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Combinação dos alvos da Hidroquinona (HQN), Ácido Tranexâmico (ATX) e Kojic Acid (KOJ)	33
Tabela 2. Coordenadas de Dock molecular com dimensões dos grids	34
Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima dos isolados do estudo.	36
Tabela 4. Comparação dos valores de CIM, CFM e razão CFM/CIM para diferentes compostos antifúngicos frente aos isolados FpBR e FpJW e ao controle.....	37
Tabela 5. Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) para a atividade in vitro da combinação de HQN com ITR contra <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gêneros <i>Fonsecaea</i> e <i>Cladophialophora</i> , árvore filogenética dos agentes etiológicos e distribuição geográfica mundial da Cromoblastomicose.	8
Figura 2. Apresentação clínica da Cromoblastomicose.....	10
Figura 3 Presença do corpúsculo muriforme no exame micológico direto em biópsia de pele de paciente com CBM.	12
Figura 4. Representação gráfica do mecanismo de ação das principais classes de antifúngicos.....	14
Figura 5. Parede celular dos fungos demáceos contendo melanina.....	17
Figura 6. Via de síntese da melanina e tipos de melanina em espécies fúngicas. ...	19
Figura 7. Melasma e representação celular do acúmulo de melanina em direção à epiderme.....	21
Figura 8. Fluxograma de definição dos alvos e dos procedimentos do estudo <i>in silico</i>	35
Figura 9. Figura ilustrativa do método tabuleiro de xadrez e leitura da combinação de ITR+ HQN para os isolados de <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	38
Figura 10. Placa de 96 poços com a combinação de ITR+ ATX para os isolados de <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	39
Figura 11. Teste de Clarificação da melanina com a Hidroquinona em ágar batata dextrose.....	41
Figura 12. Teste de clarificação da melanina em meio líquido (RPMI).....	42
Figura 13. Estrutura química das moléculas evidenciando extremidades com possíveis interação entre a melanina e os fármacos estudados	43
Figura 14. Representações tridimensionais do docking molecular das conformações de ligação entre os compostos e os alvos.	45
Figura 15. Perfis de afinidade molecular do Ácido Tranexâmico, Ácido Kójico e Hidroquinona com alvos da via de melanogênese.....	46
Figura 16. Tipos de ligações dos fármacos aos alvos e aminoácidos envolvidos. ..	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REFERENCIAL TEÓRICO	6
2.1 Breve Histórico da Cromoblastomicose	6
2.2 Agentes Etiológicos e Epidemiologia	7
2.3 Apresentação clínica.....	9
2.4 Diagnóstico	10
2.5 Achados do exame direto e histopatológico.....	11
2.6 Sequenciamento Genético	13
2.7 Tratamento.....	13
2.8 Melanina	16
2.9 Teste <i>in silico</i> e fármacos.....	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Teste <i>in vitro</i>	26
4.2 Preparo dos fármacos	27
4.3 Preparo do inóculo	28
4.4 Teste de sensibilidade	29
4.5 Método Tabuleiro de Xadrez – “Checkerboard assay”	30
4.6 Avaliação da Melanina	31
4.7 Local do Estudo <i>in vitro</i>	31
4.8 Teste <i>in silico</i>	31
4.9 Definição dos alvos	32
4.10 Docking e re-docking molecular	34
5. RESULTADOS	36
5.1 Teste <i>in vitro</i>	36
5.2 Teste <i>in silico</i>	43
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO	58
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	60
9. REFERÊNCIAS	61
10. APÊNDICE	72

1. INTRODUÇÃO

Durante a graduação em Medicina na Universidade Federal do Maranhão (UFMA), tive a oportunidade de participar, por meio de projeto de extensão, do ambulatório de Cromoblastomicose coordenado pela Prof^a Dra. Conceição Pedrozo, referência internacional na pesquisa sobre a doença. Posteriormente, ao iniciar minha atuação profissional como médica na Atenção Primária à Saúde em municípios do interior do Maranhão — Paulino Neves, Humberto de Campos e Urbano Santos — deparei-me com a elevada frequência de dermatoses de difícil diagnóstico e manejo, o que motivou minha especialização em Dermatologia. Durante esse processo formativo, em Fortaleza, chamou-me a atenção o uso terapêutico de fármacos por efeitos não primários, em especial o ácido tranexâmico, tradicionalmente utilizado em contextos de controle hemorrágico, como vivenciei na emergência oncológica do Hospital Aldenora Bello, mas que também vinha sendo empregado no tratamento do melasma, devido à sua ação indireta na melanogênese. Essa observação suscitou, ainda em 2017, a hipótese de que o ácido tranexâmico poderia exercer efeito inibitório sobre a melanina do *Fonsecaea pedrosoi*, agente etiológico da Cromoblastomicose, favorecendo a ação antifúngica do Itraconazol. Esse questionamento inicial foi compartilhado com a Prof^a Conceição, que prontamente demonstrou abertura à investigação. Anos depois, ao ingressar no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFMA, essa hipótese foi retomada e, com o amadurecimento teórico e metodológico proporcionado pelo doutorado, ampliada para incluir também a hidroquinona, reconhecida pelo seu potente efeito despigmentante. Assim se delineou a presente tese, cujo objetivo é investigar a ação adjuvante desses agentes sobre a melanogênese fúngica e sua possível contribuição para o tratamento da Cromoblastomicose.

A Cromoblastomicose (CBM) é uma doença fúngica crônica, profunda, que acomete a pele e o subcutâneo. Em 2017, foi incluída entre as doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), doenças essas que, em janeiro de 2023, entraram para um esforço mundial para erradicação até 2030 (WHO, 2021). As manifestações clínicas da doença são bastante variadas, incluem lesões nodulares, placas, verrucosas, tumorais e cicatriciais, conforme classificação proposta por Carrion em 1950 (Brito e Bittencourt, 2018). Além disso, as lesões podem ser

classificadas como leve, moderada e grave conforme a proposta de Queiroz-Telles em sua tese de doutorado em 1996, e são avaliadas por tipo, tamanho e quantidade de lesões (Queiroz-Telles e Santos, 2012).

O principal agente causador da CBM em regiões tropicais e, em especial, no estado do Maranhão é o *Fonsecaea pedrosoi* (Santos *et al.*, 2020), pertencente à família dos Demáceos ou Dematiáceos e são considerados dimórficos no habitat e na forma de vida. Fungos que pertencem a essa classe são chamados fungos negros por apresentarem melanina na sua constituição e são visualizadas duas formas reprodutivas: conídeos e micélios e corpúsculos muriformes. A forma infectante da CBM é o corpúsculo muriforme e sua presença na amostra biopsiada da pele para confirmação do diagnóstico é patognomônico da doença (Queiroz-Telles, Fahal, *et al.*, 2017).

A CBM é uma doença de difícil terapêutica, tanto pela demora diagnóstica, quanto pela cronicidade das lesões (Queiroz-Telles e Santos, 2013). Além disso, a melanina presente na constituição do fungo é um dos fatores que se considera conferir resistência a diversos meios hostis, incluindo o sistema imune do hospedeiro, com associação documentada do aumento da virulência (Chongkae *et al.*, 2019; Eisenman e Casadevall, 2012; Mora-Montes *et al.*, 2022; Nosanchuk, Stark e Casadevall, 2015; Pinto *et al.*, 2011). Os tratamentos atuais, em Cromoblastomicose, são realizados, principalmente, com o uso de antifúngicos sistêmicos, como Itraconazol (ITR) e Terbinafina (TRB) (Brito e Bittencourt, 2018) que atuam na membrana celular do fungo, interferindo, geralmente, na síntese de lipídeos. O *F. pedrosoi*, porém, tem suscetibilidade diferente aos antifúngicos atuais, ainda que ajam de maneira semelhante, e a resposta terapêutica é ruim.

Nos seres humanos, a melanina é encontrada em locais diversos, em especial, ao conferir pigmentação ao tegumento, pele e cabelo (Joly-Tonetti *et al.*, 2016). As alterações de pele causadas por distúrbios da pigmentação são chamadas discromias e podem ser hipopigmentares quando a melanina está reduzida ou hiperpigmentares quando está acumulada (Lipsker e Lenormand, 2019). Dentre as alterações da pigmentação que ocorrem com acúmulo de melanina na pele humana encontramos o Melasma. É um distúrbio adquirido, que acomete principalmente a face, com máculas hiperocrômicas, alterando a densidade dos vasos sanguíneos na

derme e aumentando o número de melanosossomos nos melanócitos (Sehgal *et al.*, 2011) e considerado um desafio terapêutico para os profissionais.

A hidroquinona (HQN) é o tratamento tópico de primeira linha para essa afecção, agindo na síntese da melanina através do bloqueio da ação da enzima tirosinase (Grimes *et al.*, 2019), importante para a conversão da tirosina até a melanina ativa, porém, com o inconveniente de causar irritação local. A utilização da HQN como agente branqueador é citada desde 1956, após Oettel, em 1936, (apud Nordlund, Grimes e Ortonne, 2006) observar que gatos pretos ficaram com pelos acinzentados após ingestão de HQN. Nos seres humanos, este fármaco é utilizado em formulações tópicas, isoladamente ou em associação com outros componentes (Hammerschmidt *et al.*, 2012) e sugere-se que, assim como em humanos, o uso no tratamento da CBM possa bloquear a produção de melanina no *F. pedrosoi* melhorando a ação do ITR.

Recentemente, o ácido tranexâmico (ATX) passou a ser usado como opção terapêutica para o Melasma (Banihashemi *et al.*, 2015; Saki, Darayesh e Heiran, 2018; Tehranchinia, Saghi e Rahimi, 2018), após uma descoberta acidental em 1979 quando Sadako, (apud Pazyar *et al.*, 2019) observou o efeito clareador no melasma de um paciente em tratamento de urticária crônica. A indicação principal para uso desse fármaco se dá para prevenção e controle de hemorragias em pós-operatório de cirurgias digestivas, urológicas, ginecológicas ou para hemofilia. Cho *et al.* (2017) demonstraram em estudo experimental que o ATX pode ser usado como agente branqueador no melasma, pois o fármaco tem capacidade de reduzir a melanogênese através da ativação de autofagia por mais de uma via, em cultura de células de melanoma. Ao avaliar as vias de síntese da melanina em fungos e em humanos, ambos os pigmentos são formados através da oxidação e polimerização de compostos fenólicos (Eisenman e Casadevall, 2012; Pal, Gajjar e Vasavada, 2014; Suwannarach *et al.*, 2019), justificando a possibilidade de ação deste fármaco no bloqueio de melanina do *F. pedrosoi* tal qual ocorre nos seres humanos

Nos últimos anos muitos fármacos vem sendo estudados e descobertos através de experimentos diversos. O uso das tecnologias tem se mostrado um grande aliado no desenvolvimento de pesquisas, em especial nas ciências da saúde. O uso racional de animais nos laboratórios e o advento da biotecnologia e bioinformática tem dado suporte de grande valor para os pesquisadores, por vezes reduzindo custos e

encurtando o trajeto de seleção de alvos/ interações para definição de intervenções. Os testes *in silico* já são uma realidade para a pesquisa de ação de fármacos ou compostos bioativos, além de trazerem informação sobre possíveis vias de sinalização ou interação entre proteínas (Komura, Watanabe e Mizuguchi, 2023).

A bioinformática mostra-se uma solução efetiva e financeiramente viável para a ampliação da gama de testes possíveis de serem realizados a partir das estruturas mínimas dos compostos (Caldwell, 2015). Os softwares e ferramentas disponíveis incluem desde a caracterização de diferentes níveis de estruturas, com definição da sequência de aminoácidos simples até a determinação tridimensional destas moléculas, traduzindo de forma multidisciplinar a informação biológica obtida dos testes *in silico*. Neste trabalho, utilizaremos a *dockagem* molecular do ATX com os alvos da via de síntese da melanina para avaliar o tipo de interação e justificar seu uso como adjuvante no tratamento da CBM e do Melasma.

Diante do exposto, o presente estudo tem por objetivo avaliar, *in vitro*, a suscetibilidade de dois isolados clínicos de *Fonsecaea pedrosoi* ao itraconazol (ITR), administrado isoladamente e em associação com a hidroquinona (HQN) e o ácido tranexâmico (ATX). Paralelamente, será realizada uma análise *in silico* para investigar potenciais interações do ATX com alvos moleculares envolvidos na via de síntese da melanina fúngica, a fim de verificar sua aplicabilidade como agente adjuvante no tratamento da Cromoblastomicose. A hipótese que fundamenta este trabalho é a de que o uso de HQN e ATX — fármacos já utilizados clinicamente em seres humanos para a modulação da melanogênese — possa ser eficaz na redução da melanina presente na parede celular de *Fonsecaea pedrosoi*, favorecendo a permeabilidade ao itraconazol e, conseqüentemente, otimizando sua eficácia terapêutica. Ressalta-se que a melanina, além de representar um importante componente estrutural da parede celular fúngica, está associada ao aumento da virulência do patógeno e à resistência frente aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Até o presente momento, não foram identificados na literatura científica estudos que avaliem a associação do ATX e/ou da HQN ao ITR no tratamento da Cromoblastomicose, o que confere caráter inédito e potencial translacional à presente investigação.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Breve Histórico da Cromoblastomicose

A CBM foi descoberta há mais de 110 anos e o principal agente causador, o *Fonsecaea pedrosoi* foi relatado no Brasil pela primeira vez em 1911 (Torres-Guerrero *et al.*, 2012) apesar da controvérsia histórica de a quem deve ser atribuído o primeiro caso. Em 1914, no estado de Minas Gerais, o alemão Wilian Rudolph relata um caso de CBM com a descrição micológica associada ao fungo *Fonsecaea pedrosoi*. Outros relatos de casos sequentes, nas Américas, associados à doença, ocorreram em 1915 nos EUA, 1920 no Brasil e 1936 na Argentina (Queiroz-Telles, *et al.*, 2017). O nome Cromoblastomicose como uma entidade separada das demais micoses causadas por fungos negros surge como necessidade de diferenciar do grupo heterogêneo das feohifomicoses, em 1974 (Ajello *et al.*, 1974).

O fungo em seu habitat natural está na forma saprófita, os conídeos ou micélios. Nos seres humanos infectados encontra-se na forma conhecida como corpúsculo muriforme ou, ainda, corpos escleróticos. Esta característica de ter duas formas de vida (saprófita e parasita) somada a capacidade de se reproduzir por conídios e corpúsculos, atribui ao *F. pedrosoi* a qualidade de fungo dimórfico. Apesar de também ser chamada de cromomicose e estar assim registrada na classificação internacional de doenças (CID-10), o termo cromoblastomicose foi definido pelos micologistas/especialistas como mais adequado para designar a doença e diferenciá-la de outras micoses profundas (Brito e Bittencourt, 2018). Atualmente, a Cromoblastomicose está classificada sob os códigos internacionais de doenças CID-10: B43 e CID-11: 1F24.

Em 2013, a Universidade Federal do Maranhão (UFMA) teve a honra de sediar o Simpósio Internacional em comemoração aos 100 anos da descoberta da CBM, evento de elevada relevância científica que reuniu os principais especialistas mundiais na área, incluindo o então presidente da *International Society for Human and Medical Mycology* (ISHAM). A coordenação do evento foi realizada pela Prof.^a Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo, referência internacional nos estudos sobre Cromoblastomicose, cuja atuação tem sido decisiva para o fortalecimento da pesquisa micológica em regiões tropicais, especialmente no Brasil.

A Prof.^a Conceição integra a Rede Internacional de Pesquisadores em Cromoblastomicose, grupo colaborativo multidisciplinar que atua na vigilância, pesquisa translacional, diagnóstico e desenvolvimento terapêutico da doença. Esta rede reúne diversos países, com o México, França, Argentina, Índia, China e Brasil, entre outros. A participação ativa da professora nessa rede reforça sua liderança científica e o papel estratégico da UFMA e do estado do Maranhão como epicentro tanto da ocorrência da Cromoblastomicose quanto da produção técnico-científica dedicada ao enfrentamento da doença. A elevada endemicidade no estado e os esforços locais de pesquisa conferem ao Maranhão uma posição de destaque internacional na busca por soluções diagnósticas e terapêuticas frente a essa micose profunda e negligenciada.

2.2 Agentes Etiológicos e Epidemiologia

Os fungos demáceos, especialmente os pertencentes aos gêneros *Cladophialophora* (Figura 1A) e *Fonsecaea* (Figuras 1B e 1C), representam os agentes etiológicos mais frequentemente implicados na etiopatogenia da Cromoblastomicose. Em alguns casos menos frequentes também encontramos o gênero *Rhinocladiella*, *Phialophora* e *Exophiala* (Ariani, Rizal e Ledika Veroci, 2023). Análises filogenéticas indicam que esses microrganismos compartilham um ancestral comum, evidenciando uma origem evolutiva comum dentro do grupo dos fungos melanizados, o que reforça sua proximidade taxonômica e funcional no contexto das micoses subcutâneas (Figura 1D). Os climas tropicais e subtropicais são as áreas geográficas com maior número de casos relatados, (Krzyściak, Pindycka-Piaszczyńska e Piaszczyński, 2014) sendo algumas regiões mais prevalentes, mas não exclusivas, para uma espécie. Na América do Norte encontramos o México como local de maior endemicidade, sendo o *Fonsecaea pedrosoi* com maior relato de casos (Bonifaz, Carrasco-Gerard e Saul, 2001). Já na América Latina, temos os gêneros *Fonsecaea* e *Cladophialophora*, enquanto na Ásia, com Japão, China e Índia importantes focos da doença, com caso de *Fonsecaea* e *Exophiala* (Queiroz-Telles, Hoog, et al., 2017) (Figura 1E). No estado Maranhão, o fungo *Fonsecaea pedrosoi* é o agente etiológico mais encontrado (Santos et al., 2020).

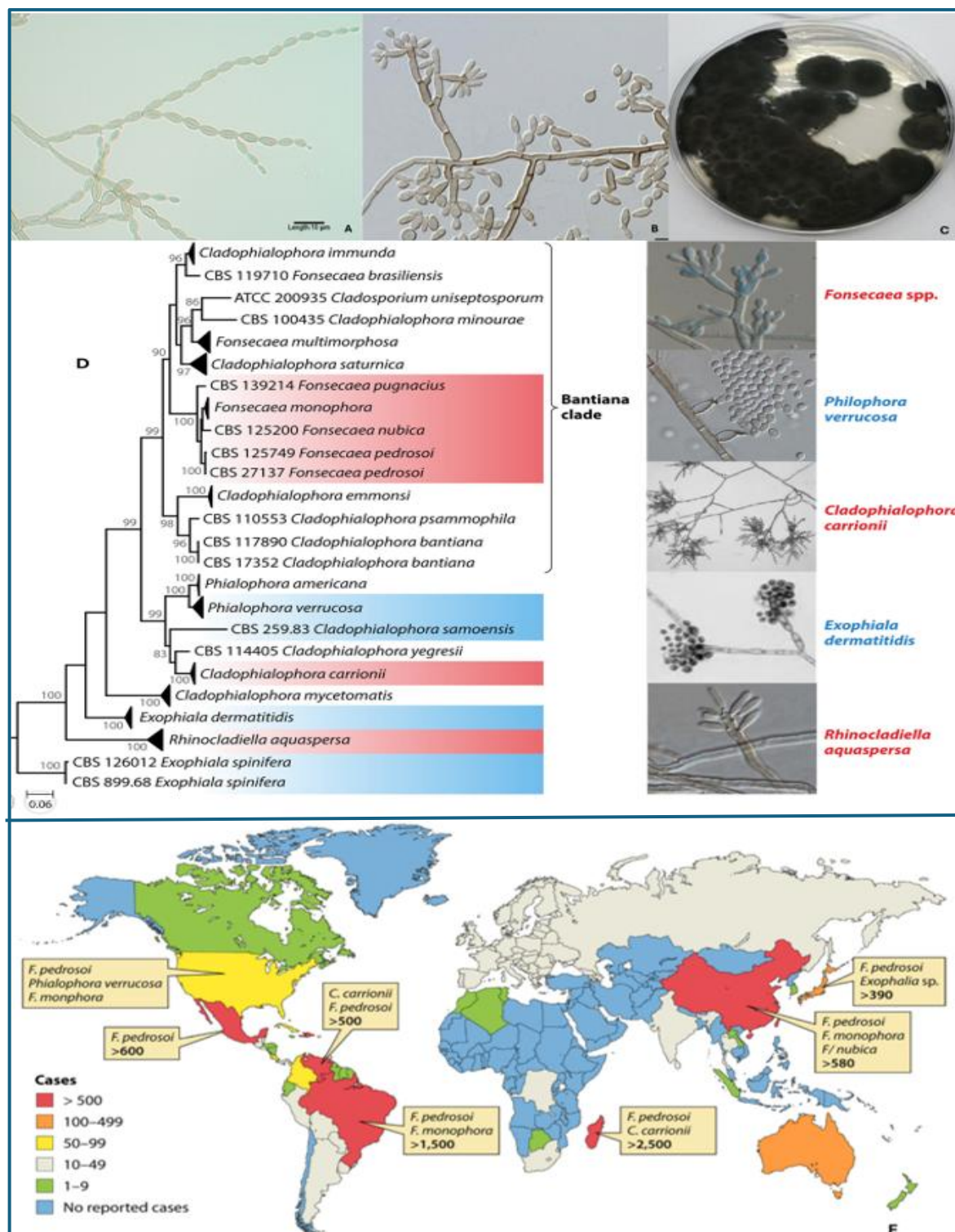


Figura 1. Gêneros *Fonsecaea* e *Cladophialophora*, árvore filogenética dos agentes etiológicos e distribuição geográfica mundial da Cromoblastomicose. **A)** *Cladophialophora bantiana* **B)** *Fonsecaea pugnacius* **C)** Colônia de *Fonsecaea pedrosoi* **D)** Árvore Filogenética dos fungos causadores da Cromoblastomicose. **E)** Distribuição dos casos de Cromoblastomicose com agente etiológico. **Fonte:** A) Revankar e Sutton, 2010, B) e C) Azevedo, *et al.*, 2015; D) e E) Queiroz-Telles, *et al.*, 2017.

A Cromoblastomicose (CBM) é uma doença causada por fungos demáceos, especialmente o *Fonsecaea pedrosoi* (Santos *et al.*, 2007; Torres-Guerrero *et al.*, 2012) e é a segunda micose de inoculação em maior prevalência no mundo (Queiroz-Telles, Fahal, *et al.*, 2017). O fungo tem como habitat natural as áreas em decomposição do solo e os lavradores ou indivíduos que trabalham com a terra e/ou os animais, consequentemente, são os mais acometidos pela CBM (Avelar-Pires *et al.*, 2013), que pode ser considerada uma doença ocupacional. No Maranhão, historicamente a situação das quebradeiras de coco babaçu, uma atividade rural realizada com as profissionais sentadas diretamente no solo, confere a esta profissão um importante foco da doença (Pedroso e Silva *et al.*, 1995; Silva de Azevedo, 2010), embora a prevalência dos casos seja maior no sexo masculino (Queiroz-Telles *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2021). Apesar dos casos serem amplamente relatados como mais prevalentes em homens, os dados reais sobre incidência e prevalência são desconhecidos, especialmente por se tratar de doença negligenciada (Santos, Azevedo e Queiroz-Telles, 2025). Dessa forma, o perfil epidemiológico da doença, que incide predominantemente em populações economicamente vulneráveis, com limitado acesso a medidas de proteção individual e a serviços especializados de saúde favorece a natureza crônica das lesões, aliada ao atraso diagnóstico frequente, contribuindo para a persistência da infecção e para o agravamento do quadro clínico ao longo do tempo.

2.3 Apresentação clínica

A CBM tem um amplo espectro de apresentação clínica, que inclui desde lesões nodulares, passando por lesões em placas até extensas lesões verrucosas e de aspecto tumoral (Figura 2A). A classificação pelo tipo de lesão foi proposta por Carrion em 1950 (Brito e Bittencourt, 2018) e os critérios de gravidade por Queiroz-Telles em 1996 (Queiroz-Telles, 1997). Além disso, mais recente vem se demonstrado que a presença da mutação no gene CARD-9 pode ser um fator predisponente para infecções mais graves de CBM (Herman *et al.*, 2024). A presença de pontos negros nas lesões da pele, classicamente chamados de *black dots*, ricos em células fúngicas e visíveis a olho nu, são um marcador importante para suspeita clínica do diagnóstico

(Figura 2B), associada à epidemiologia. As lesões causadas pela Cromoblastomicose acometem desde as camadas mais superficiais da pele até o tecido subcutâneo dos indivíduos infectados, podendo evoluir com comprometimento progressivo e crônico da derme e hipoderme (Figura 2C). A infecção ocorre, em geral, por meio da implantação traumática do fungo na pele, frequentemente associada a pequenos ferimentos causados por espinhos, fragmentos vegetais ou material orgânico contaminado, especialmente em ambientes rurais. Os membros representam os sítios anatômicos mais comumente afetados, dada sua maior exposição a traumas durante atividades laborais, como agricultura, extrativismo e coleta de lenha.



Figura 2. Apresentação clínica da Cromoblastomicose.

Fonte: A) Santos, *et. al.*, 2020; B) Purim, *et. al.*, 2017 e Dall-E (IA).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da CBM é clínico-epidemiológico, entretanto, a doença costuma levar de 3 meses a 3 décadas até o diagnóstico, variando conforme a gravidade e favorecendo a cronicidade das lesões (Santos, *et. al.*, 2020). Tem comportamento insidioso em grande parte dos pacientes e já foram relatados casos que progrediram para malignização tecidual (Azevedo *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2010) e de acometimento em regiões atípicas, como a face, orelha e a disseminação cerebral (Azevedo, De *et al.*, 2015; Iwatsu, Takano e Okamoto Shoji, 1983; Tawade *et al.*, 2018). A confirmação do diagnóstico é realizada através da biópsia da lesão que

identifica corpos escleróticos/ muriformes, uma característica histopatológica fundamental da doença (Queiroz-Telles, Fahal, *et al.*, 2017).

Ao longo dos anos as técnicas diagnósticas evoluíram significativamente passando de métodos exclusivamente clínicos e histopatológicos para abordagens laboratoriais mais elaboradas. O cultivo em meios como Sabouraud revelou-se um avanço crucial para a identificação dos fungos causadores da CBM, permitindo a distinção entre *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladophialophora carrionii* e outras espécies dematiáceas (Brito e Bittencourt, 2018). Além disso, exames como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento de DNA passaram a ser utilizados para uma identificação mais precisa dos agentes etiológicos (Najafzadeh *et al.*, 2018) aumentando a acurácia do diagnóstico. Mais recentemente, técnicas imunológicas e proteômicas, como espectrometria de massas MALDI-TOF, começaram a ser estudadas para aprimorar a identificação rápida e específica dos fungos (Maubon *et al.*, 2022). Apesar desses avanços, o diagnóstico precoce ainda representa um desafio, especialmente em regiões com acesso limitado a métodos moleculares, tornando essencial a capacitação de profissionais para o reconhecimento clínico e o uso combinado de técnicas tradicionais e modernas, justificando a necessidade de incluir no rol das doenças tropicais negligenciadas e aumentar aporte de recursos públicos.

2.5 Achados do exame direto e histopatológico

O exame micológico direto é um dos principais métodos diagnósticos iniciais da CBM, permitindo a visualização das formas fúngicas diretamente a partir de amostras clínicas da pele infectada. A característica mais marcante desse exame é a presença dos corpos escleróticos (ou células muriformes), estruturas arredondadas, espessas, de coloração marrom-escura devido à deposição de melanina, frequentemente observadas em grupos ou isoladas (Figura 3) (Borges *et al.*, 2022; Correia *et al.*, 2010). Essas células são patognomônicas da doença e podem ser evidenciadas por coloração com KOH a 10–20% (Brito e Bittencourt, 2018), além de preparações coradas com azul de lactofenol ou Gram modificado. Diferente de outros fungos filamentosos, os agentes da CBM raramente apresentam hifas no exame direto

de biópsias mais profundas, exceto em escamas superficiais (Queiroz-Telles *et al.*, 2009), o que auxilia na diferenciação de outras micoses subcutâneas, como esporotricose e feo-hifomicose. O exame micológico direto é um exame rápido e de fácil execução, podendo ser utilizado em diversos cenários, desde que haja um profissional instruído e orientado para visualização do exame.

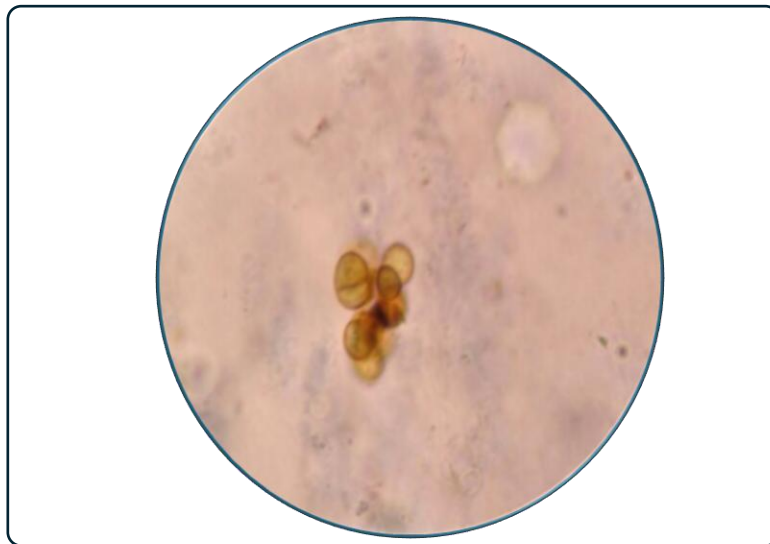


Figura 3 Presença do corpúsculo muriforme no exame micológico direto em biópsia de pele de paciente com CBM.

Fonte: Banco de imagens Prof^a Dr^a Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo

A CBM apresenta achados histopatológicos característicos, sendo que a presença de células muriformes (ou corpos escleróticos) são vistas no tecido em meio a uma resposta inflamatória granulomatosa crônica. O exame histológico geralmente revela um granuloma epitelióide, composto por células gigantes multinucleadas de Langherans e um infiltrado linfoplasmocitário, além de neutrófilos em áreas de microabscessos (Zeeshan *et al.*, 2024). Há também a formação de fibrose progressiva no tecido afetado, justificando a cronicidade da doença e a dificuldade terapêutica (Bonifaz, Carrasco-Gerard e Saul, 2001). As colorações histológicas mais utilizadas incluem Hematoxilina e Eosina (HE), que evidencia a reação inflamatória e as células muriformes, e Fontana-Masson, que confirma a presença de melanina nas paredes celulares fúngicas, auxiliando na diferenciação de outras micoses subcutâneas (Purim *et al.*, 2017). Em casos avançados, observa-se hiperplasia pseudoepiteliomatosa, um achado reacional que pode ser confundido com carcinoma espinocelular, tornando o diagnóstico diferencial fundamental (Queiroz-Telles, Hoog, et al., 2017).

2.6 Sequenciamento Genético

O sequenciamento genético tem desempenhado um papel crucial na identificação e caracterização dos fungos causadores da cromoblastomicose ao longo dos anos. Tradicionalmente, a identificação desses patógenos baseia-se em características morfológicas e métodos fenotípicos, com acurácia >50% e especificidade de >90% quando realizado o exame micológico direto (Borges *et al.*, 2022), embora possa apresentar limitações na distinção precisa entre espécies devido à variabilidade morfológica e à subjetividade da análise. Com o advento das técnicas de biologia molecular, o sequenciamento de regiões específicas do DNA, como o espaçador interno transcrito (ITS) do DNA ribossômico, tornou-se uma ferramenta essencial para a identificação acurada dos agentes etiológicos da Cromoblastomicose (Sun *et al.*, 2012). Essa abordagem molecular permite superar as limitações da identificação morfológica tradicional, especialmente diante da variabilidade fenotípica dos fungos dematiáceos. Além da acurácia diagnóstica, o sequenciamento genético tem desempenhado um papel crucial na elucidação da taxonomia e na reconstrução filogenética desses microrganismos, oferecendo subsídios para compreender as relações evolutivas entre os diferentes gêneros e espécies envolvidas na etiologia da doença (Smith *et al.*, 2024). Dessa forma, a integração de dados genéticos não apenas aprimora a caracterização dos isolados clínicos, mas também contribui para o entendimento da diversidade genômica e da origem comum dos agentes da Cromoblastomicose, reforçando a importância dessas ferramentas na micologia médica contemporânea.

2.7 Tratamento

Apesar da CBM já ser uma doença estudada e identificada há mais de um século, os tratamentos atuais apresentam baixa resposta e exigem longos anos de medicações, com taxas de cura ainda pequenas, e mesmo a exérese cirúrgica das lesões só tem indicação em doença restrita e em momentos iniciais da doença (Veasey *et al.*, 2017). Os antifúngicos utilizados atualmente, tem mecanismo de ação bastante semelhante, interferindo, em especial na membrana celular (Figura 4), como por exemplo, o Itraconazol (ITR), que inibe diretamente a biossíntese de ergosterol; a Terbinafina (TRB), age indiretamente, através da inibição da enzima esqualeno-

epoxidase, causando redução do ergosterol, por consequência; ou ligando-se aos esteróis dos fungos e alterando a permeabilidade celular, a depender de sua concentração, como a Anfotericina B (AMP-B).

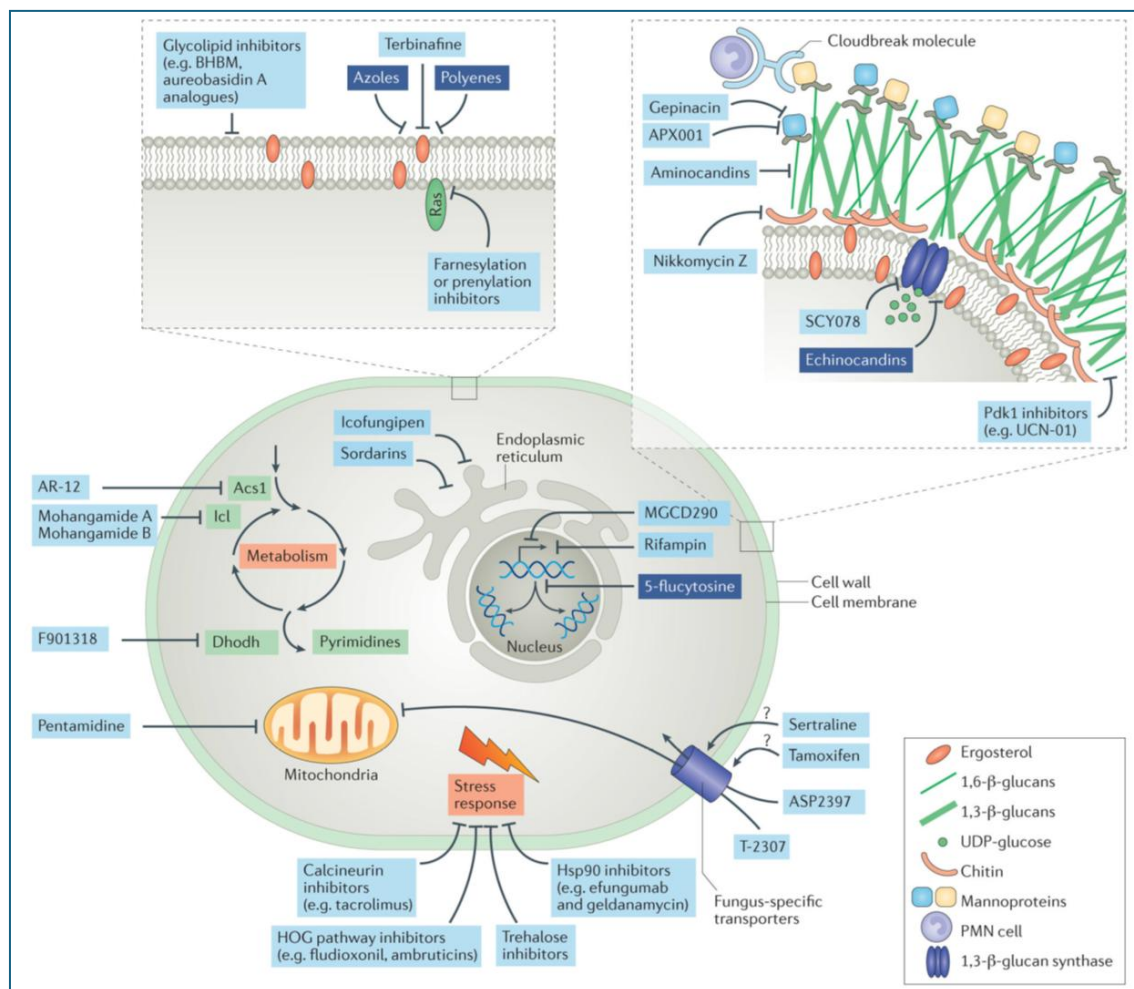


Figura 4. Representação gráfica do mecanismo de ação das principais classes de antifúngicos.

Fonte: Perfect, 2017.

O *F. pedrosoi*, tem suscetibilidade diferente aos antifúngicos atuais, ainda que ajam de maneira semelhante. Araújo (2015) em avaliação da suscetibilidade dos principais antifúngicos sistêmicos usados para o tratamento da CBM, demonstrou *in vitro* que o ITR está entre os medicamentos com menor concentração inibitória mínima (CIM), justificando seu uso como opção terapêutica. Embora o estudo de Andrade (2004), já tenha demonstrado que ao longo do tratamento a CIM deste fármaco tenha aumentado, ainda é o tratamento de escolha com taxas de cura que variam de 40-70%. Outras opções terapêuticas têm mostrado, *in vitro*, boa suscetibilidade, como

voriconazol e posaconasol (Queiroz-Telles e Santos, 2013), entretanto esses fármacos não estão disponíveis amplamente, inclusive no Brasil. Soma-se a isso, a preocupação global constante quanto à resistência às drogas de tratamento nas diversas doenças infecciosas. Embora com os agentes etiológicos da CBM ainda não ocorra com frequência (Smith *et al.*, 2024), a necessidade de terapia que seja mais eficaz e exija menos tempo de tratamento é um dos principais desafios para a cura da doença.

O ITR é, ainda, a opção terapêutica com maior acesso, com resultados razoáveis e vem sendo usado para tratamento das micoses há muitas décadas. Porém, o tempo de tratamento é bastante extenso, com necessidade de seguimento bastante variado, chegando a durar em média 6,3 anos nos pacientes do estado Maranhão (Santos *et al.*, 2020). A cura da CBM ocorre quando o paciente tem melhora da lesão - resposta clínica – e com ausência do fungo nas biópsias de pele ao longo do tratamento – cura micológica. As taxas podem variar de 15-80% a depender do tratamento ou combinação de tratamentos utilizados (Bonifaz, Carrasco-Gerard e Saul, 2001), justificando-se a necessidade de um padrão-ouro de tratamento que tenha resultados mais uniformes para a CBM.

Do ponto de vista farmacológico, um tratamento adjuvante é caracterizado como aquele cujo objetivo não é a cura ou o controle da doença de forma isolada, mas sim a potencialização, complementação ou facilitação da eficácia do tratamento principal (Brai, *et.al.*, 2023). Trata-se, portanto, de uma estratégia terapêutica que visa atuar de maneira sinérgica, modulando alvos secundários ou otimizando a ação do agente farmacológico primário. No contexto da Cromoblastomicose (CBM), a utilização de fármacos com finalidade adjuvante ainda é incipiente na literatura científica. Uma busca na base de dados PubMed, com os termos “Adjuvant therapy Chromoblastomycosis”, sem aplicação de filtros, retornou poucos registros de estudos, o que evidencia a escassez de investigações nesse campo e ressalta a originalidade da proposta deste trabalho. Embora muitos estudos sobre Cromoblastomicose (CBM) não utilizem explicitamente o termo adjuvância em seus títulos ou descritores, observa-se na literatura a adoção de estratégias terapêuticas que envolvem a associação de fármacos ou intervenções não antifúngicas com o intuito de potencializar os efeitos do tratamento convencional. Um exemplo notável é

o uso do imunomodulador tópico imiquimode, que atua tanto sobre o sistema imune inato quanto o adaptativo, sendo tradicionalmente empregado no manejo de verrugas virais, ceratoses actínicas e carcinoma basocelular superficial. Estudos recentes demonstram a eficácia desta terapia adjuvante no tratamento da CBM, inclusive no estado do Maranhão (Santos, Azevedo e Queiroz-Telles, 2025; Valentin et al., 2024; Santos et al., 2020).

Além disso, fármacos com propriedades antitumorais têm sido explorados nesse contexto, como a acitretina, um retinoide sintético com efeitos imunomoduladores e antiproliferativos (Belda, Criado e Passero, 2020), e o 5-fluorouracil, utilizado historicamente por sua ação antimetabólica (Coelho *et al.*, 2024). Outras abordagens terapêuticas não antifúngicas também vêm sendo descritas, incluindo o uso de terapia térmica localizada (aplicação de calor ou frio) e terapia fotodinâmica, isoladamente ou associada ao ácido 5-aminolevulínico (ALA-PDT), com resultados promissores em estudos experimentais e clínicos (Huang et al., 2019; Queiroz-Telles e Santo, 2013) e mesmo compostos biológicos como o Ajoene, derivado do alho e com comprovada ação antimicrobiana, utilizado especialmente em CBM causada por *Cladophialophora carrionii* (Pérez-Blanco, 2003). Essas evidências indicam que diversas estratégias terapêuticas vêm sendo testadas como coadjuvantes no manejo da CBM. No entanto, até o momento, não há um protocolo terapêutico padronizado com eficácia universalmente reconhecida, o que reforça a importância de estudos que explorem novas associações farmacológicas com potencial sinérgico e aplicabilidade clínica.

2.8 Melanina

A melanina é um pigmento encontrado em organismos procariontes e eucariontes, de difícil definição da sua estrutura por não ser solúvel em água ou outros fluidos orgânicos (Mandal *et al.*, 2007). Apesar disso, a extração da melanina dos fungos filamentosos já foi realizada através de meios básicos e, também, a identificação das vias dihidroxifenilalanina (DOPA) e dihidroxinaftaleno (DHN) (Dadachova *et al.*, 2007; Pal, Gajjar e Vasavada, 2014). Os fungos demáceos são chamados, também, de fungos negros por terem a capacidade de produzir melanina

na constituição da sua parede celular (Figura 5), conferindo-lhes maior resistência a meios diversos, inclusive ao sistema imune do hospedeiro (Caligiorne *et al.*, 2019). Em micro-organismos patogênicos, como o *Vibrio cholerae*, agente causador da cólera, sabe-se que a melanina protege a bactéria do choque térmico e hiperosmolar nas águas, gerando bactérias resistentes as mudanças climáticas (Urán e Cano, 2008). Apesar da dificuldade em extrair a melanina dos fungos, aponta-se que a presença deste pigmento na parede celular confere ao *Cryptococcus neoformans*, por exemplo, maior virulência (Chatterjee *et al.*, 2015). Além disso, fungos melanizados, como o *Cladosporium sphaerospermum*, foram encontrados na Usina Radioativa de Chernobyl e nos solos próximos, mesmo com altos níveis de radiação, entendendo-se como fator de proteção a esses fungos (Gessles, Egorova e Belozerskaya, 2014).

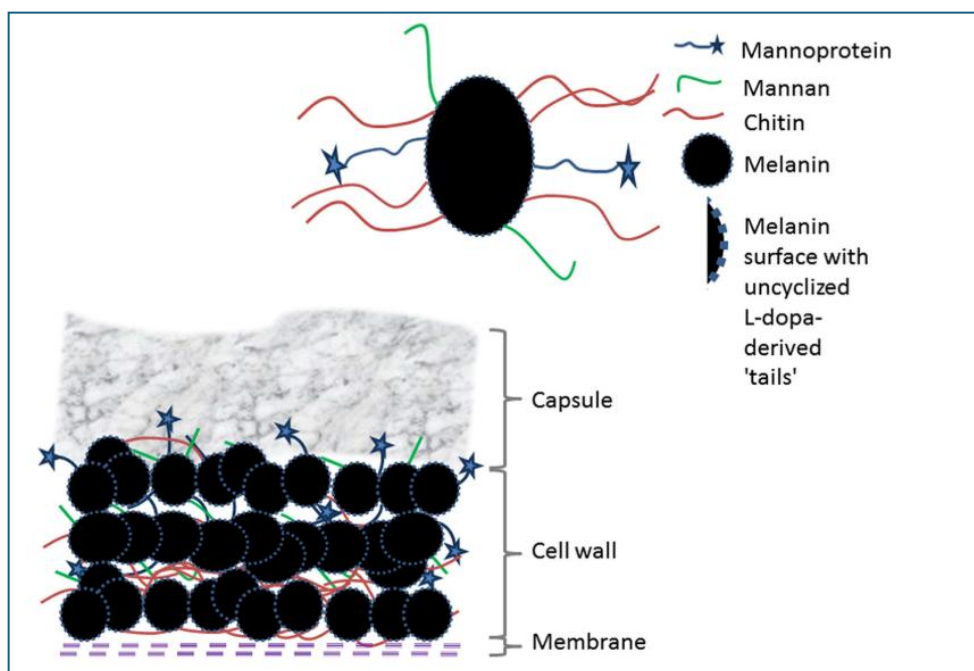


Figura 5. Parede celular dos fungos demáceos contendo melanina.

Fonte: Nosanchuk, Stark e Casadevall, 2015.

As doenças causadas por fungos melanizados desencadeiam uma resposta inflamatória tecidual intensa, mediada por uma complexa dinâmica entre o agente etiológico e o sistema imune do hospedeiro (Ogawa *et al.*, 2016). A melanina fúngica, presente na parede celular desses microrganismos, desempenha papel central nesse processo, conferindo-lhes maior capacidade de evasão imunológica e resistência a tratamentos antifúngicos. Dentre as propriedades atribuídas à melanina

destacam-se: a modulação da resposta das citocinas, com consequente redução da fagocitose e interferência na ação de fármacos (Nosanchuk, Stark e Casadevall, 2015); atividade antioxidante; inibição da cascata do sistema complemento (Pinto et al., 2011); capacidade de suportar a exposição à radiação ionizante (Dadachova et al., 2007); e a habilidade de quelar radicais livres e metais pesados (Apte et al., 2013). Esses mecanismos conferem aos fungos melanizados um grau elevado de virulência e resistência frente ao sistema imune do hospedeiro (Cordero e Casadevall, 2017).

Nas últimas décadas, a melanina passou a ser objeto de estudos intensivos em diferentes espécies fúngicas, especialmente naquelas com potencial patogênico para seres humanos e plantas (Chongkae et al., 2019; Zhang et al., 2019; Suwannarach et al., 2019; Thornton et al., 2015; Fernandez e Koide, 2013; Medina et al., 2018; Pal, Gajjar e Vasavada, 2014; Mandal et al., 2007; Paolo et al., 2006; Suryanarayanan et al., 2004). No caso específico da *Fonsecaea pedrosoi*, principal agente etiológico da Cromoblastomicose, estudos demonstram que a melanina não apenas atua como fator de proteção contra agentes externos, mas também representa um possível alvo terapêutico (Pinto et al., 2011; Bocca et al., 2006;). Assim, o reconhecimento desse pigmento como um determinante de patogenicidade consolida sua relevância como foco estratégico para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

A melanina, tanto em seres humanos (Figura 6A) quanto em fungos, é sintetizada por vias bioquímicas semelhantes, envolvendo a oxidação de fenóis e subsequente polimerização catalisada por enzimas específicas, até a formação do pigmento biologicamente ativo. As enzimas que atuam em uma única etapa desse processo são conhecidas como polifenoloxidasas ou lacases, as quais são dependentes de íons cobre para sua atividade catalítica (Janusz et al., 2020). Já as enzimas que participam de duas etapas consecutivas da síntese — promovendo tanto a hidroxilação quanto a oxidação dos substratos fenólicos — são classificadas como tirosinases. As vias de síntese que segue, nos seres humanos, passam pela DOPA-melanina, tendo como substrato o aminoácido dihidroxifenilalanina (DOPA); e, nos fungos, também pela DHN-melanina que na presença do acetato é convertida em dihidroxinaftaleno (DHN) (Kosaka Kajishima, 2009; Pal, Gajjar e Vasavada, 2014), a depender da espécie (Figura 6B)

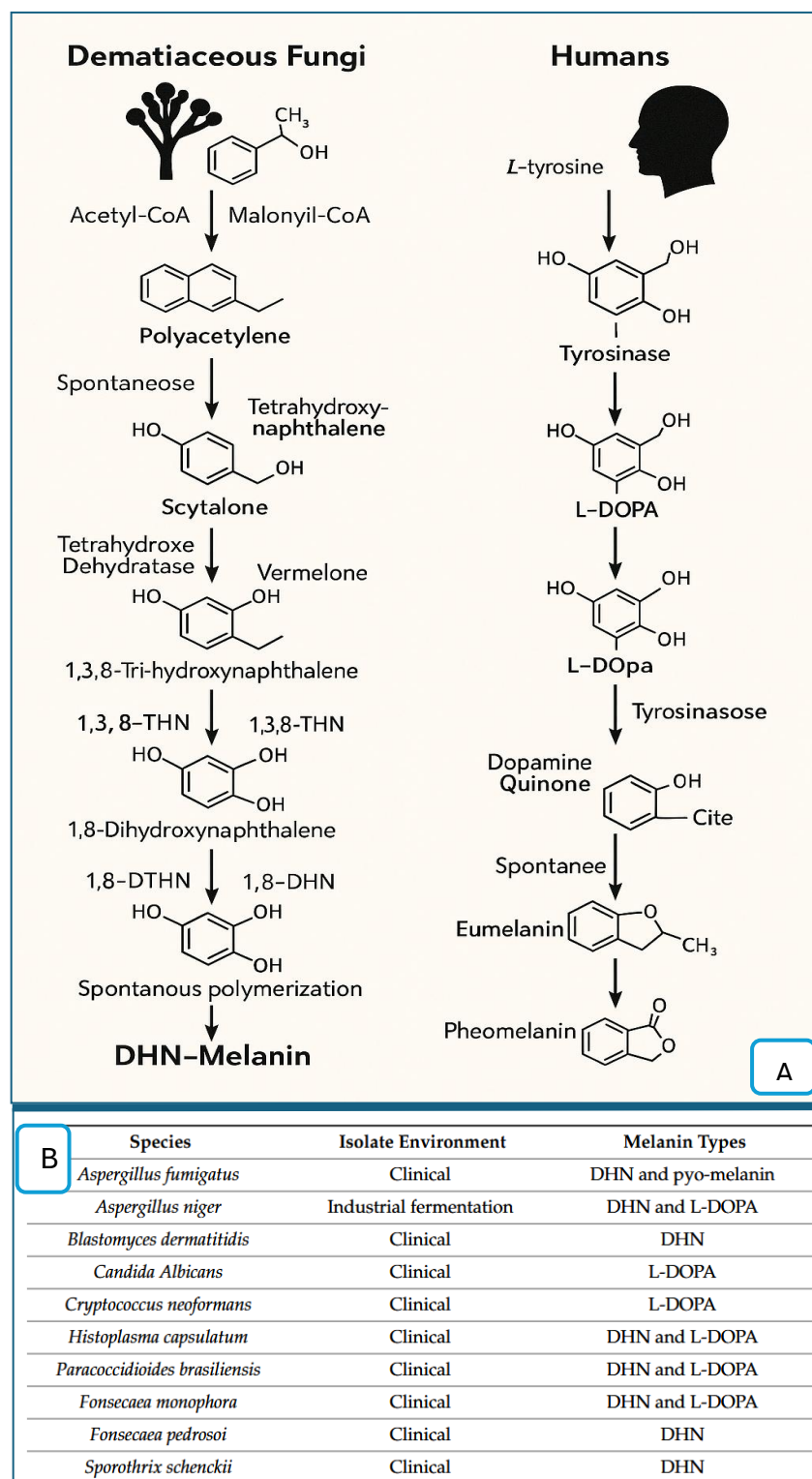


Figura 6. Via de síntese da melanina e tipos de melanina em espécies fúngicas.

A) Representação gráfica da biossíntese de melanina humana e fúngica; **B)** Descrição do tipo de melanina por espécie fúngica.

Fonte: **A)** Imagem criada pela autora com auxílio de Inteligência Artificial. **B)** Liu, et. al, 2021.

Nos seres humanos, a melanina é amplamente reconhecida por seu papel na pigmentação da pele, além de exercer funções relevantes na fotoproteção e neuroproteção. A estrutura química do pigmento apresenta características semelhantes nos diferentes compartimentos anatômicos onde é encontrada, sendo sua biossíntese fortemente dependente da atividade da enzima tirosinase, localizada nos melanossomos (D'Mello *et al.*, 2016). Essas similaridades entre os processos biossintéticos da melanina em humanos e fungos sustentam a hipótese de que fármacos que interferem na melanogênese humana possam ter potencial terapêutico no controle de microrganismos melanizados.

O triciclazol (TCZ), um fungicida agrícola usado, especialmente, nas culturas de arroz, é um inibidor direto da produção de melanina pela via DHN e tem sido utilizado em testes *in vitro* na tentativa de aumentar a sensibilidade dos fungos aos fármacos de tratamento da CBM (Coelho, Figueiredo-Carvalho, *et al.*, 2022). Já foi possível avaliar que há redução do pigmento melânico (Urán e Cano, 2008), e o estudo de Bocca e colaboradores (2006) demonstrou que com a inibição da biossíntese de melanina houve favorecimento da fagocitose pelos macrófagos e, portanto, diminuiu a resistência do fungo.

A enzima catalizadora tirosinase é alvo de alguns fármacos com objetivo de obter efeito despigmentante como a arbutina, o ácido kójico (KOJ), o ácido azelaico, o ácido linoleico e a ceramida, entre outros (Shin e Park, 2014). O efeito clareador é buscado em alterações da pigmentação da pele, causando manchas com acúmulo de melanina, como o melasma (Figura 7). Esta é uma dermatose que ocorre por alteração da atividade dos melanócitos focalmente e é induzida ou acelerada, especialmente, pela radiação ultravioleta (Mahmoud *et al.*, 2010; Miot *et al.*, 2009). Entretanto, alterações hormonais seja pelo uso de hormônios sintéticos quanto fisiológicos, como a gestação, podem favorecer o acúmulo do pigmento (Rajaratnam, *et al.*, 2010).



Figura 7. Melasma e representação celular do acúmulo de melanina em direção à epiderme.

Fonte: Cassiano et al., 2022; Storm, CA, apud Miot et al., 2009.

As dermatoses pigmentares tipo não melanoma são frequentes na população. Talvez a mais antiga e conhecida entre elas é o melasma. A hidroquinona, atualmente é a recomendação de primeira linha no tratamento de lesões leves (Grimes e Callender, 2019; Zhou e Baibergenova, 2017) e é o fármaco usado para comparativos dos mais diversos tratamentos para o melasma, oral, tópico ou por microabrasão (Banihashemi *et al.*, 2015; Farshi, 2011; Saki, Darayesh e Heiran, 2018; Tehranchinia, Saghi e Rahimi, 2018). Derivados da HQN, compostos químicos hidroxifenólicos, participam da via de síntese da melanina. O principal mecanismo de ação deste fármaco é a inibição da tirosinase, considerando-se também que possa inibir a síntese de ácido ribonucleico (RNA), degradando os melanossomas (Limberguer, 2015). Para a HQN, os estudos utilizam as concentrações de 2 a 5% (Banihashemi *et al.*, 2015; Nordlund, Grimes e Ortonne, 2006; Pazyar *et al.*, 2019; Saki, Darayesh e Heiran, 2018), especialmente em comparação com outros fármacos, sendo a apresentação em creme de 40mg/g a mais comumente encontrada.

Recentemente o ATX, um fármaco antifibrinolítico, vem sendo utilizado como opção terapêutica para o tratamento do melasma, com resultados significativos (Lee *et al.*, 2016; Rosario, Del *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2019). A forma de uso tem sido

variada, desde o uso oral até injetável, seja por meio venoso, seja por meio de infiltração por microabrasão da pele acometida. O principal mecanismo de ação deste fármaco se dá pela formação de um complexo reversível, de alta afinidade pela lisina, impedindo que o plasminogênio se ligue à plasmina (Maeda, 2022). O plasminogênio está presente nas células basais da epiderme e pode participar na melanogênese pela ação dos raios ultravioleta (Nogueira e Ferreira, 2018). Além disso, no melasma, há aumento da densidade vascular e da expressão de fatores de angiogênese (Kim *et al.*, 2017), demonstrando relação importante com o sistema sanguíneo, visto que a irrigação da pele, fisiologicamente, se dá na derme. Supõem-se que a inibição do sistema plasminogênio/ plasmina pelo ATX seja capaz de interferir na relação entre melanócitos e queratinócitos, além de reduzir a melanogênese, já que a plasmina, além de ser um fator de crescimento de fibroblastos, também é um importante fator de crescimento de melanócitos (Lee, Thng e Goh, 2016; Wah Tse, Derm e Hui, 2013). Nas bases de dados pesquisadas, não foi possível encontrar um protocolo padrão para análise da ação do ATX no tratamento do Melasma *in vitro*, somente para seu uso recomendado em bula. Nos estudos encontra-se: a) avaliação do efeito do fármaco *in vitro* no tratamento de hemofilia, adicionando o ATX ao sangue dos pacientes na concentração de 100µg/ml a fim de representar dose em nível sérico; b) um estudo em cães da raça *Beagle* pesquisando o efeito de altas doses (50mg/Kg) do medicamento induzindo coagulação em animais saudáveis (Kutter *et al.*, 2019); c) avaliação da resposta do fármaco injetado em ratos de pós-operatório de hepatectomia, também a 50mg/kg (Sobral *et al.*, 2016). Uma revisão recente que buscou encontrar a dose mínima em que o ATX é capaz de inibir fibrinólise refere que mais estudos são necessários para confirmar a menor dose, porém, concentrações de 10-15mg/l estão próximas do nível máximo de inibição, e já atingem um resultado significativo (Picetti *et al.*, 2019). Os estudos de Spierings e colaboradores (2019), avaliando modalidades de tratamento do melasma e o multicêntrico de Zhu e colaboradores (2019), mostram doses do ATX que variam de 500 a 1500mg/dia.

Nesse sentido, compreendendo que fungos e a espécie humana sintetizam a melanina por vias e compostos similares e que ambos dependem da ação da tirosinase para formação da melanina final; ressaltando que este pigmento confere maior resistência e maior proteção ao fungo *F. pedrosoi* ao sistema imune do

hospedeiro; supondo que ao reduzir o acúmulo de melanina tal qual ocorre no Melasma, induzindo branqueamento, a hipótese deste estudo é que ao usar o ATX e a HQN no intuito de reduzir a melanina do fungo, o ITR poderá ter sua ação beneficiada quando utilizados em associação, favorecendo o tratamento da CBM.

2.9 Teste in silico e fármacos

A bioinformática tornou-se ponto importante para as pesquisas em saúde, em especial, na descoberta de medicamentos, integrando técnicas computacionais avançadas para acelerar e aprimorar o desenvolvimento de novos fármacos (Ferreira, Oliva e Andricopulo, 2011). Sua aplicação abrange desde a identificação de alvos terapêuticos até a simulação da interação de medicamentos e a absorção no corpo humano proporcionando uma compreensão mais profunda dos mecanismos moleculares envolvidos. Simulações computacionais podem encurtar o tempo de testagem de fármacos, especialmente em casos de pandemia, como a COVID-19 em que diversos testes avaliando inibidores eficazes contra as proteínas do SARS-CoV-2 (Mercado-Juárez *et al.*, 2024), tentaram identificar fármacos e reposicionamento de drogas, acelerando a busca por tratamentos eficazes (Guedes *et al.*, 2021).

Diversos softwares, webservers e ferramentas vem sendo utilizadas para facilitar a análise de vastos conjuntos de dados genômicos, transcriptômicos e proteômicos, permitindo a identificação de biomarcadores e alvos moleculares relevantes para diversas patologias (Caldwell, 2015). Ferramentas de modelagem molecular e simulação computacional são utilizadas para prever interações entre moléculas e seus alvos biológicos, otimizando a seleção de compostos candidatos para estudos experimentais (Ge *et al.*, 2024). Essa abordagem reduz significativamente o tempo e os custos associados ao desenvolvimento de novos medicamentos, além de diminuir a necessidade de testes em modelos animais nas fases iniciais da pesquisa.

A simulação computacional desempenha um papel crucial na predição de como os medicamentos interagem com o organismo humano. Modelos biofarmacêuticos baseados em fisiologia permitem prever a absorção, distribuição, metabolização e excreção de fármacos, auxiliando na compreensão de sua eficácia e segurança (Komura, Watanabe e Mizuguchi, 2023). Entre as vantagens das simulações, temos a possibilidade de testar populações específicas em que,

eticamente, não é possível testar fármacos, como gestantes e crianças, por exemplo, a partir do uso de gêmeos digitais em que partes específicas ou doenças podem ser simuladas digitalmente (Kamel Boulos e Zhang, 2021).

Avanços recentes demonstram o potencial da bioinformática na descoberta de medicamentos. Ferramentas de modelagem molecular e bases de dados de estruturas, como o Protein Data Bank (PDB) (Consortium, 2018), são fundamentais nesse campo e são utilizados amplamente para a descoberta da ação de fármacos, através da identificação de sítios de ligação e na otimização de compostos terapêuticos. Além disso, a docagem molecular ou *docking* molecular, é uma técnica computacional amplamente utilizada no planejamento racional de fármacos ao prever a ligação preferencial de uma molécula (ligante) à proteína-alvo, formando um complexo estável (Agu *et al.*, 2023). Diferentes conformações dos ligantes são testadas, até identificar uma conformação (pose) mais provável na interação ligante-alvo selecionando a de menor energia livre, pois, essa é a mais provável de ocorrer (Sliwoski *et al.*, 2014). Essa previsão, portanto, auxilia na compreensão das interações intermoleculares e na estimativa da afinidade de ligação entre as moléculas envolvidas e auxilia a tomada de decisão quanto ao uso fármaco para *in vitro* ou *in vivo*, facilitando a seleção de drogas estudadas.

A CBM é uma doença de extrema importância para a população mundial e para o estado do Maranhão e a inclusão no rol das Doenças Tropicais Negligenciadas pela OMS faz com que o olhar sobre esta doença seja ampliado. Além disso, a crescente preocupação quanto à resistência a antifúngicos exige a investigação de novas terapias farmacológicas para o tratamento da doença e a utilização da bioinformática encurta os trajetos para descoberta de ações de fármacos. Soma-se a isso que as populações mais vulneráveis para a doença são as de menor poder aquisitivo, tornando-se fundamental a necessidade de viabilizar tratamentos de amplo acesso, com custo baixo, justificando a realização deste estudo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a ação do Ácido Tranexâmico e da Hidroquinona em isolados clínicos de *Fonsecaea pedrosoi*

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Ácido Tranexâmico (ATX) e da hidroquinona (HQN) em isolados de *F. pedrosoi*.
- Verificar efeito da combinação dos fármacos através dos índices das concentrações inibitórias fracionadas (ICIF)
- Comparar a resposta do pigmento melânico do *F. pedrosoi* quando exposto ao ATX, HQN e Triciclazol (TCZ).
- Avaliar *in silico* a interação do ATX com os alvos relacionados a via de síntese da melanina em comparação com HQN e KOJ.
- Sugerir o mecanismo de ação do ATX em relação à redução da síntese da melanina, através das interações *in silico*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho integra o projeto intitulado **CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E GENÉTICA EM PACIENTES PORTADORES DE CROMOBLASTOMICOSE NO ESTADO DO MARANHÃO**, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (CEP/UFMA), sob o parecer nº 1.276.342. Pacientes em acompanhamento no Centro de Referência em Doenças Infecto-Parasitárias (CREDIP/UFMA) foram convidados a participar da pesquisa, e, após concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram submetidos à coleta de amostras das lesões cutâneas para fins diagnósticos e experimentais. As amostras de tecido foram obtidas por meio de biópsia com bisturi tipo *punch*, sendo processadas para exame micológico direto, cultivo fúngico e análise histopatológica. O isolamento e identificação do agente etiológico foram realizados por meio de cultura e confirmação da espécie *Fonsecaea pedrosoi* por sequenciamento genético.

Este estudo compreende um delineamento experimental laboratorial do tipo *in vitro* e *in silico*. No componente *in vitro*, foram utilizados dois isolados clínicos de *F. pedrosoi* para avaliar a resposta do fungo, na forma de conídios, à exposição ao Itraconazol (ITR), isoladamente e em associação com Ácido Tranexâmico (ATX) e Hidroquinona (HQN). Já o componente *in silico* consistiu na simulação computacional de interações moleculares, por meio de *docking molecular*, visando investigar o potencial de ligação do ATX aos alvos envolvidos na via de síntese da melanina. Essa etapa buscou fundamentar a hipótese de uso do ATX como agente adjuvante no tratamento da Cromoblastomicose, uma vez que seu efeito inibitório sobre a melanogênese não é primariamente descrito para microrganismos.

4.1 Teste *in vitro*

Foram utilizados dois isolados clínicos de *Fonsecaea pedrosoi*, previamente confirmados por critérios clínicos e laboratoriais, incluindo exame micológico direto, análise histopatológica, cultivo em meio seletivo e confirmação por sequenciamento genético. As amostras foram colhidas antes do início de qualquer intervenção terapêutica, caracterizando-se, portanto, como isolados virgens de

tratamento. Para controle de qualidade dos ensaios antifúngicos, foi empregada a cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC 90028).

Os isolados clínicos utilizados neste estudo foram denominados FpJW e FpBR, com as seguintes características:

- **FpJW:** paciente do sexo masculino, 43 anos, apresentando lesão grave em forma de placa infiltrativa localizada em membro inferior direito.
- **FpBR:** paciente do sexo masculino, 80 anos, com lesão extensa em placa localizada em membro inferior, com tempo estimado de evolução clínica de aproximadamente 30 anos.

As amostras fúngicas foram inicialmente isoladas em meio Ágar Mycosel (Becton Dickinson, NJ, USA) por um período de 12 dias. Em seguida, os isolados foram repicados em meio Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) ou Ágar Batata Dextrose (PDA) (Sigma-Aldrich, MO, USA) e incubados a 26°C por 10 a 15 dias, até o desenvolvimento de colônias características — enegrecidas, de aspecto aveludado, compatíveis com fungos melanizados. Para os ensaios laboratoriais, as células fúngicas foram cultivadas em meio SDA ou PDA, por um período de 6 a 26 dias, a 28°C, a fim de garantir o crescimento adequado para os testes subsequentes.

4.2 Preparo dos fármacos

Os fármacos ácido tranexâmico (ATX), hidroquinona (HQN) e itraconazol (ITR) foram inicialmente diluídos em solução fisiológica estéril, enquanto o triciclazol (TCZ) foi diluído em etanol grau analítico. Para todos os ensaios antifúngicos, os isolados clínicos de *Fonsecaea pedrosoi* foram submetidos ao método de microdiluição em caldo, conforme as diretrizes estabelecidas pelo documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com adaptações metodológicas específicas.

As soluções estoque dos fármacos foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) e/ou em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), na concentração de 1.000 µg/mL. A partir dessas soluções, foram realizadas diluições seriadas, com a solução inicial concentrada 100 vezes a concentração final desejada. Posteriormente, cada solução não aquosa foi diluída na proporção de 1:100, obtendo-se uma

concentração final duas vezes superior àquela utilizada no ensaio, para garantir a diluição exata no momento da distribuição nos poços.

As concentrações testadas foram as seguintes:

- **Itraconazol (ITR):** 0,031 a 16 µg/mL
- **Hidroquinona (HQN):** 48 a 25.000 µg/mL
- **Triciclazol (TCZ):** 1 a 625 µg/mL
- **Ácido Tranexâmico (ATX):** 48 a 25.000 µg/mL

As soluções foram distribuídas em placas de 96 poços, com as diferentes concentrações dos fármacos, reservando poços para os controles: de crescimento fúngico (contendo apenas o inóculo em RPMI 1640); e de esterilidade, contendo exclusivamente o meio RPMI 1640, sem inóculo.

Todos os testes das placas de 96 poços foram realizados em triplicata, em dias distintos, para garantir reprodutibilidade. Em casos de discrepância entre os resultados das repetições, uma quarta rodada experimental foi conduzida para validação dos dados.

4.3 Preparo do inóculo

Para a preparação do inóculo, foram adicionados 5 mL de solução fisiológica estéril sobre a colônia fúngica cultivada, seguida de raspagem superficial com o auxílio de uma alça plástica estéril, a fim de desprender e suspender os conídios presentes na superfície da colônia. A suspensão obtida foi transferida para um tubo tipo Falcon de 15 mL e submetida à agitação em vortex por 20 segundos, com o objetivo de desagregar os conídios dos conidióforos. Em seguida, a suspensão foi filtrada por membrana de nylon com porosidade de 40 nm, com a finalidade de reter fragmentos de hifas e demais elementos miceliais. O filtrado foi então centrifugado a 3.000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante cuidadosamente descartado e o pellet celular ressuspenso em 1 mL de solução tampão PBS contendo Tween 20%.

A densidade celular da suspensão foi ajustada entre 0,15 e 0,17 unidades de absorbância, por meio de leitura espectrofotométrica a 530nm, valor correspondente a uma concentração estimada entre 10^5 e 10^6 conídios/mL, conforme estabelecido pelo protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). O número de conídios foi validado por contagem manual em câmara de

Neubauer. Para a inoculação nas placas de microtitulação, a suspensão ajustada foi diluída na proporção de 1:50 em meio de cultivo sintético RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, MO, USA), tamponado com MOPS (Sigma-Aldrich, MO, USA), garantindo condições padronizadas para os ensaios de susceptibilidade antifúngica.

4.4 Teste de sensibilidade

Foi utilizada uma placa de microtitulação de 96 poços para cada um dos isolados clínicos de *Fonsecaea pedrosoi* (FpJW e FpBR), além de uma placa adicional para o controle de qualidade, contendo a cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC 90028). As placas foram devidamente seladas e incubadas a 35°C sob condições estáveis.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM), definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir completamente (100%) o crescimento fúngico visível, foi determinada por inspeção visual direta para os seguintes compostos: itraconazol (ITR), ácido tranexâmico (ATX), hidroquinona (HQN) e o fungicida agrícola triciclazol (TCZ). Os fármacos foram testados em diluições seriadas ao longo das colunas 1 a 11 da placa, sendo a 12ª coluna destinada aos controles: nas linhas A a D, controle de crescimento fúngico (CC), contendo apenas o inóculo e meio RPMI; e nas linhas E a H, controle de esterilidade, com meio estéril sem inóculo. A leitura dos controles foi realizada após 48 horas de incubação, enquanto a leitura final dos poços contendo os isolados clínicos de *F. pedrosoi* foi efetuada após 14 dias, conforme as recomendações dos documentos M27 e M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Para a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) - definida como a menor concentração do fármaco capaz de provocar a morte do microrganismo - uma alíquota de 5 µL de cada poço correspondente à CIM foi transferida para placas contendo meio Ágar Batata Dextrose (PDA) estéril. A ausência de crescimento fúngico foi interpretada como indicativo de atividade fungicida. A relação entre CFM e CIM foi utilizada para classificação da atividade dos fármacos, sendo considerada fungicida quando $CFM/CIM \leq 4$ e fungistática quando $CFM/CIM > 4$, conforme os critérios descritos por Siddiqui, *et. al.* em 2012.

4.5 Método Tabuleiro de Xadrez – “Checkerboard assay”

O método tabuleiro de Xadrez é utilizado para avaliação de efeito de drogas em combinação e utiliza concentrações variadas dos fármacos, tendo como referência a CIM, no intuito de definir se há sinergismo ou antagonismo entre os fármacos (Odds, 2003). Os ensaios foram realizados em microplacas estéreis de 96 poços e o meio RPMI-1640/MOPS. A HQN foi testada em concentrações variando de 0,3 a 1560µg/mL, o ATX de 48 a 25.000µg/mL e o ITR de 0,015 a 1µg/mL para FpBr e 0,062 a 4µg/mL para FpJW. A partir de 100µL do inóculo fúngico, incubados com 50µL de HQN e 50µL de ITR ou 50µL de ATX e 50µL de ITR com diferentes combinações de concentrações de fármacos, a 28°C, por 7 dias. A atividade antifúngica foi avaliada por inspeção visual para as CIMs com 100% de inibição. Para esta etapa do estudo, o TCZ foi excluído por ser um agrotóxico e não ter permissão para uso em humanos. Após a incubação, as interações foram determinadas pelo Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF), calculadas pela seguinte fórmula:

$$ICIF = \frac{CIM\ HQN\ em\ combinação}{CIM\ HQN\ isolado} + \frac{CIM\ ITR\ em\ combinação}{CIM\ ITR\ isolado}$$

As ICIFs foram determinadas para todas as combinações possíveis de diferentes concentrações em que não houve crescimento visível dos microrganismos (Gómez-López *et al.*, 2003). O resultado da interação é classificado a partir dos seguintes valores:

Sinérgica: $\Sigma FICI \leq 0,5$;

Aditiva: $0,5 > \Sigma FICI \leq 1$;

Indiferente: $1 > \Sigma FICI \leq 4,0$;

Antagônica: $\Sigma FICI > 4,0$.

4.6 Avaliação da Melanina

Após crescimento em meio PDA por 7 dias, foi adicionado em placas distintas o ITR e a HQN no valor da CIM, CIM/2 e CIM/4. Como controle, as placas foram comparadas ao seu respectivo isolado, semeado em meio PDA, sem adição de fármacos. Em meio líquido RPMI, foi realizado o teste com a amostra FpJW após crescimento em tubo falcon durante 10 dias a 30°C. O isolado foi adicionado às soluções de ITR, TCZ e HQN nas concentrações CIM, CIM/2 e CIM/4. O tubo do isolado FpJW contendo HQN foi comparado com o tubo controle e com o tubo TCZ, por já ser um conhecido inibidor da via de síntese da melanina, porém, um agrotóxico. Após foi realizada a avaliação da melanina em combinação do ITR + HQN, sendo:

- Combinação A: HQN 195µg/mL + ITR 0,062 µg/mL = CIM/32 do ITR + CIM/4 HQN;
- Combinação B: HQN 195µg/mL + ITR 0,031 µg/mL = CIM/64 ITR + CIM/4 HQN.

Como controle utilizou-se o tubo que contendo somente o isolado FpJW em meio RPMI. As placas e tubos foram fotografadas após 7 dias de exposição aos fármacos.

4.7 Local do Estudo *in vitro*

Houve realização de um teste piloto em parceria com a Universidade Ceuma, no laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos Patogênicos e com o Laboratório Cedro sob responsabilidade do professor Rodrigo Holanda. O estudo final foi realizado no NIBA (Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) sob responsabilidade do professor Valério Monteiro Neto.

4.8 Teste *in silico*

O estudo *in silico* teve como objetivo avaliar o potencial de interação dos fármacos ácido tranexâmico (ATX) e hidroquinona (HQN) com estruturas relacionadas à melanina humana, a fim de justificar seu possível uso como agentes adjuvantes no tratamento da Cromoblastomicose (CBM). A hipótese fundamenta-se na capacidade desses compostos, já utilizados no tratamento de hiperpigmentações cutâneas como o melasma, de interferirem na síntese ou na estabilidade da melanina — um

componente-chave da parede celular do *Fonsecaea pedrosoi*, com papel relevante na virulência e resistência antifúngica.

A primeira etapa da análise consistiu na verificação da similaridade estrutural entre os fármacos investigados e os compostos envolvidos na biossíntese da melanina, com base nos princípios físico-químicos que regem as interações moleculares por complementaridade de forma, carga e afinidade química. Em seguida, procedeu-se à aplicação de técnicas de *docking* e *re-docking* molecular para avaliar o acoplamento das moléculas aos alvos específicos da via melanogênica. Como controle positivo de interação, foi utilizado o ácido kójico (KOJ), substância amplamente empregada como despigmentante no tratamento do melasma, cuja ação é bem documentada como inibidor da enzima tirosinase — etapa chave na biossíntese da melanina. A comparação entre os perfis de ligação de ATX, HQN e KOJ permitiu uma análise comparativa da afinidade dos compostos pelos alvos selecionados, contribuindo para a validação da hipótese de seu uso como adjuvantes terapêuticos na CBM. Essa etapa foi realizada em parceria com o laboratório de Química Geral e Analítica da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), sob responsabilidade do professor Cleydson Breno.

4.9 Definição dos alvos

Para a seleção dos alvos moleculares, os seguintes passos foram utilizados:

- 1- O código Smile dos fármacos (ATX, HQN, KOJ e TCZ) foram inseridos no PASSonline para predição de atividade, sendo considerados alvos com Probabilidade de atividade (P_a) $>70\%$
- 2- Alvo com $P_a > 70\%$ foram inseridos na busca do PDB (Protein Data Bank) com filtro de resolução $< 2,5\text{\AA}$
- 3- A primeira estrutura encontrada no PDB para cada alvo com $P_a > 70\%$ foi selecionada para o ATX, HQN, TCZ e para KOJ
- 4- Para o TCZ, por ter somente um alvo com $P_a > 70\%$, foram colhidas as informações das duas primeiras estruturas
- 5- Encontradas 25 estruturas para o KOJ; 2 para o TCZ; 49 para o ATX e 24 para a HQN, inviabilizando a testagem.

- 6- Foram selecionados, então, os compostos da via metabólica que são produzidos e/ou convertidos nos melanossomos e que fazem parte da síntese de melanina:
- LEUCODOPACHROME,
 - 5,6-DIHYDROXYINDOLE-2-CARBOXYLIC ACID;
 - L-DOPACHROME; 5,6-DIHYDROXYINDOLE;
 - INDOLE-5,6-QUINONE; DOPAQUINONE.
- 7- Com a molécula selecionada acima, a estrutura química (*canonical smile*) foi inserida na busca do PDB com os seguintes filtros:
- a. método experimental por difração de Raio-X
 - b. resolução <2,5Å.
- 8- As três primeiras estruturas encontradas, quando disponível mais de uma, foram selecionadas:
- INDOLE-5,6-QUINONE** - 6L9C, 5KWF, 2R24
- DOPAQUINONA** – 2YX9
- LEUCODOPACHROME** – não encontrado
- 5,6-DIHYDROXYINDOLE-2-CARBOXYLIC ACID** – 7TUR, 7D6G, 7YK9
- L-DOPACHROME** – não encontrado
- 5,6-DIHYDROXYINDOLE** – 5M8R, 5M8S, 5M8L
- 9- Após comparação com as estruturas encontradas anteriormente para a pesquisa smile dos fármacos (descritas no item 5), selecionou-se os alvos comuns em ambas as etapas (Tabela 1).

Tabela 1. Combinação dos alvos da Hidroquinona (HQN), Ácido Tranexâmico (ATX) e Kojic Acid (KOJ)

Alvos	HQN	ATX	AKJ
7TUR	☑	☑	☑
2R24		☑	☑
5KWF	☑	☑	☑

7TUR, 2R24 e 5KWF correspondem às estruturas cristalográficas

- 10- As moléculas testadas com as estruturas (alvos) foram os fármacos:
- Ácido tranexâmico
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5526>
 - Hidroquinona <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/785>
 - Ácido Kójico <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3840>
- 11- Acrescentou-se a molécula 5M8N por ser uma molécula publicada e depositada, relacionada a tirosinase humana
- 12- O TCZ foi excluído da análise *in silico* por não ter permissão de uso em humanos, somente como agrotóxico.

4.10 Docking e re-docking *molecular*

Foram realizados os testes de Docking Molecular no *webserver DockThor* (<https://dockthor.incc.br/v2/>). As estruturas cristalográficas foram baixadas do PDB e através do *software Discovery Studio 2016* para checagem dos seguintes parâmetros: ângulos *phi-psi*, conformação do resíduo e mapa de densidade eletrônica, além da avaliação de regiões mal definidas, presença de ligantes e localização das coordenadas (Tabela 2). As estruturas proteicas e os ligantes foram preparados e salvos em formato .pdb e, então, encaminhados para a simulação de docking molecular no Docktor.

Tabela 2. Coordenadas de Dock molecular com dimensões dos grids

Receptor	Coordenadas do Grid Center	Dimensões do Grid
2R24	X = 15,376299	X = 16,15
	Y = -6,423075	Y = 14,20
	Z = 14,841455	Z = 13,25
5KWF	X = 20,368027	X = 16,15
	Y = 0,072100	Y = 14,20
	Z = 22,638071	Z = 13,25
5M8N	X = -30,526316	X = 16,15
	Y = -3,718351	Y = 14,20
	Z = -21,986283	Z = 13,25
7TUR	X = -8,406000	X = 15,10
	Y = -9,958000	Y = 14,20
	Z = 15,092000	Z = 13,30

XYZ correspondem aos eixos das três dimensões

Os fármacos usados para o estudo de Docking Molecular foram Hidroquinona (HQN), Ácido Tranexâmico (ATX) e Ácido Kójico (KOJ) e ancorados aos alvos 7TUR, 2R24, 5KWF e 5M8N. Para a realização do re-docking, os ligantes das moléculas foram removidos e, após reinseridos para avaliar se as moléculas foram capazes de assumir conformação de ligação semelhante. Considera-se valores ótimos de RMSD (desvio quadrático médio) entre os ligantes quando esse valor é inferior à 2Å. Por serem fármacos já estabelecidos e autorizados para uso em humanos, não foi necessário realizar teste farmacocinético de ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) *in silico*. Abaixo encontra-se a Figura 8 que ilustra os procedimentos utilizados para o teste.

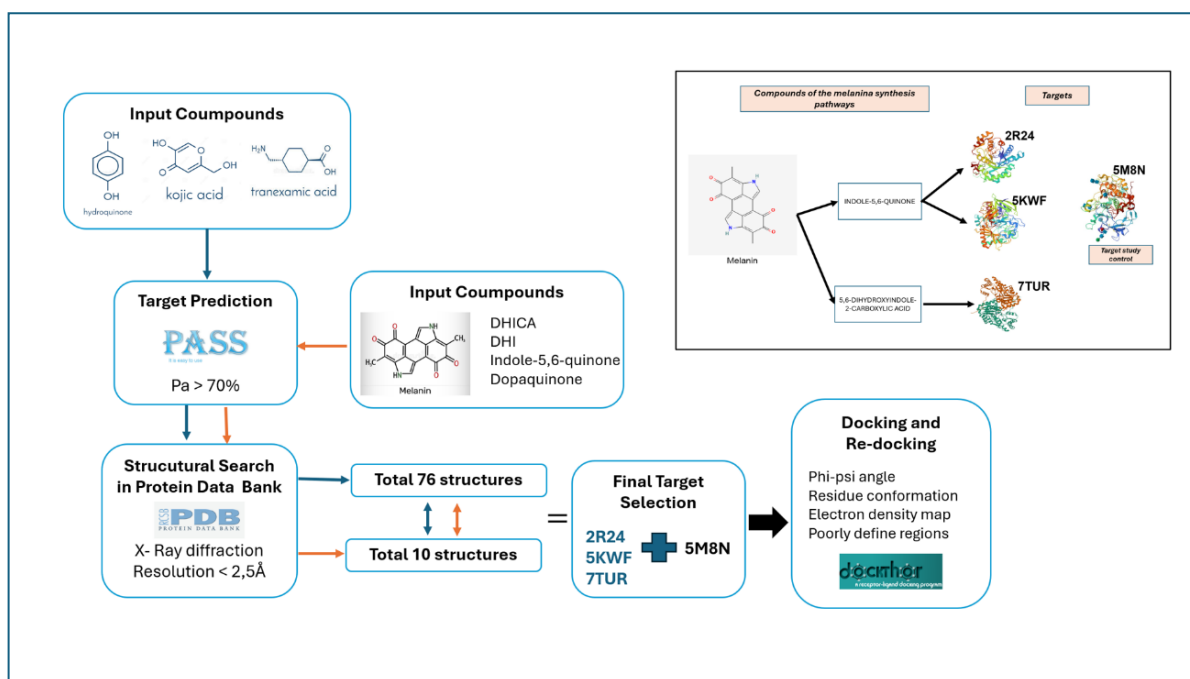


Figura 8. Fluxograma de definição dos alvos e dos procedimentos do estudo *in silico*.

5. RESULTADOS

5.1 Teste in vitro

A concentração inibitória mínima, CIM, de cada isolado e do controle foi determinada por inspeção visual e tiveram os seguintes valores, considerando 100% de inibição de crescimento:

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima dos isolados do estudo.

	FpJW <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	FpBR <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Controle <i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)
Itraconazol	2µg/mL	0,5µg/mL	0,25µg/mL
Hidroquinona	780µg/mL	780µg/mL	390µg/mL
Ácido Tranexâmico	>25.0000µg/mL	>25.0000µg/mL	>25.0000µg/mL
Triciclazol	156µg/mL	156µg/mL	32µg/mL

Baseado no ponto de corte epidemiológico recentemente publicado (Smith, *et. al.*, 2025), com CIM = 0,5µg/mL, o isolado FpJW apresenta resistência ao ITR enquanto o FpBR, sensibilidade. Apesar disso, quando avaliada a concentração fungicida mínima (CFM), que corresponde à menor concentração de composto em que há morte do fungo, ambos os isolados apresentaram valor da CIM igual ao valor da CFM, resultando em razão igual 1. Ou seja, o efeito de todas as drogas avaliadas (HQN, ITR e TCZ) foi fungicida. O ATX, apresentou valores de CIM muito elevados e não teve inibição do crescimento fúngico, portanto, não foi possível avaliar o tipo de atividade para este fármaco. Na Tabela 4, encontramos os valores de CIM e CFM dos fármacos para os isolados fúngicos.

Tabela 4. Comparação dos valores de CIM, CFM e razão CFM/CIM para diferentes compostos antifúngicos frente aos isolados FpBR e FpJW e ao controle.

Composto	Micro-organismo											
	FpBR				FpJW				<i>C. albicans</i> ATCC90028			
	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CFM/CIM	ATIVIDADE	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CFM/CIM	ATIVIDADE	CIM(µg/mL)	CFM (µg/mL)	CFM/CIM	ATIVIDADE
ATX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HQN	780	780	1	fungicida	780	780	1	fungicida	390	-	-	-
ITR	0,5	0,5	1	fungicida	2	2	1	fungicida	0,25	16	64	fungistático
TCZ	156	156	1	fungicida	156	156	1	fungicida	32	-	-	-

Nota: A razão CFM/MIC é calculada para determinar tipo de atividade das drogas testadas. Considera-se fungistática se CFM/CIM>4 ou fungicida CFM/CIM≤4.

Os efeitos da combinação de HQN com ITR sobre os dois isolados de *F. pedrosoi* no método Tabuleiro de Xadrez demonstrou que a combinação dos fármacos reduz à metade o valor da CIM da HQN para ambos os isolados. A CIM do ITR na combinação, para FpJW variou de CIMx2 (4µg/mL) à CIM/32 (0,0625µg/mL), correspondendo à coluna 3, linhas A-G. Para a amostra FpBR, quando combinados os fármacos a CIM do ITR variou de CIMx2 (1 µg/mL) a CIM/16 (0,03125µg/mL), correspondendo à coluna 3 e linhas A-F, na placa de 96 poços. A Figura 9 ilustra os achados, simulando a placa de 96 poços.

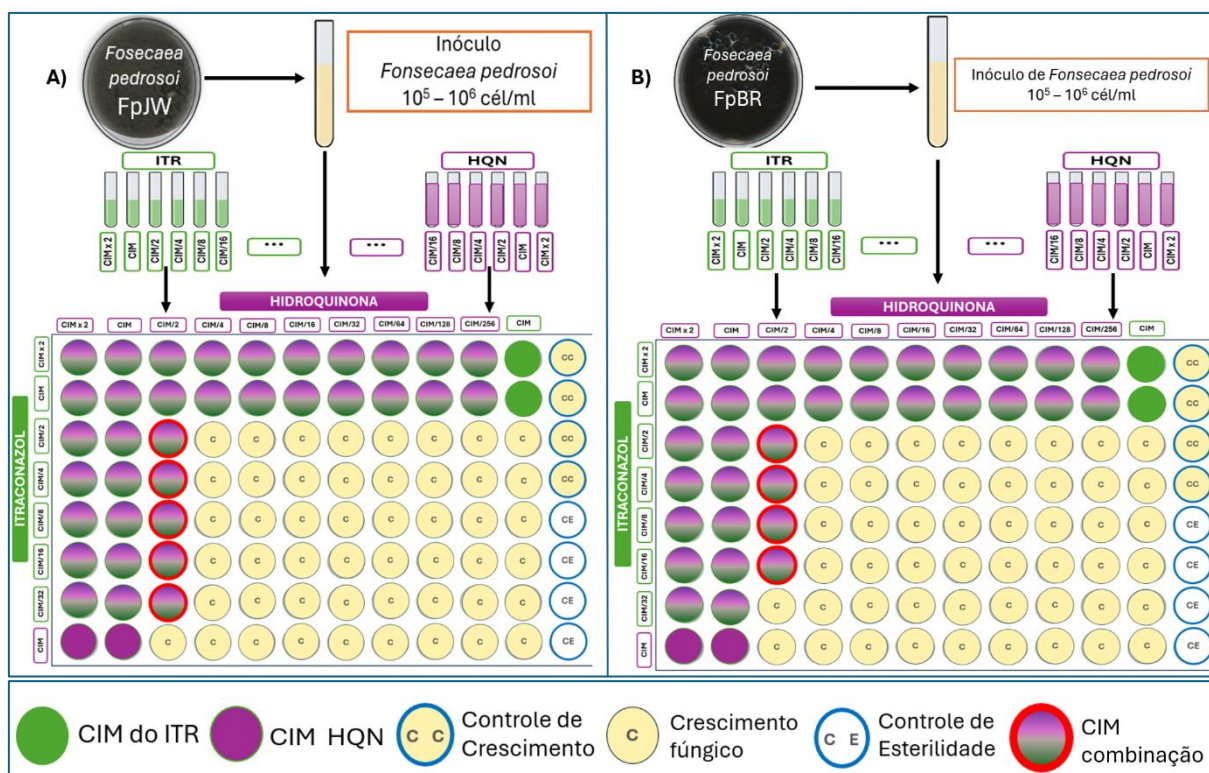


Figura 9. Figura ilustrativa do método tabuleiro de xadrez e leitura da combinação de ITR+ HQN para os isolados de *Fonsecaea pedrosoi*.
A) Combinação de ITR + HQN para o isolado FpJW; **B)** Combinação para o isolado FpBR.

A Figura 10 mostra a imagem da placa da combinação dos fármacos ITR+ ATX para FpJW e FpBR. Apesar de não ter sido possível calcular CIM (100%) para o ATX, embora a concentração testada tenha sido elevada, a visualização da placa mostra possível efeito até o cruzamento dos poços que correspondem a concentração de CIM/2 do ITR e de 6250µg/mL para o ATX, não se podendo esclarecer se o efeito é de inibição do crescimento ou de clareamento, quando o ATX está associado ao ITR.

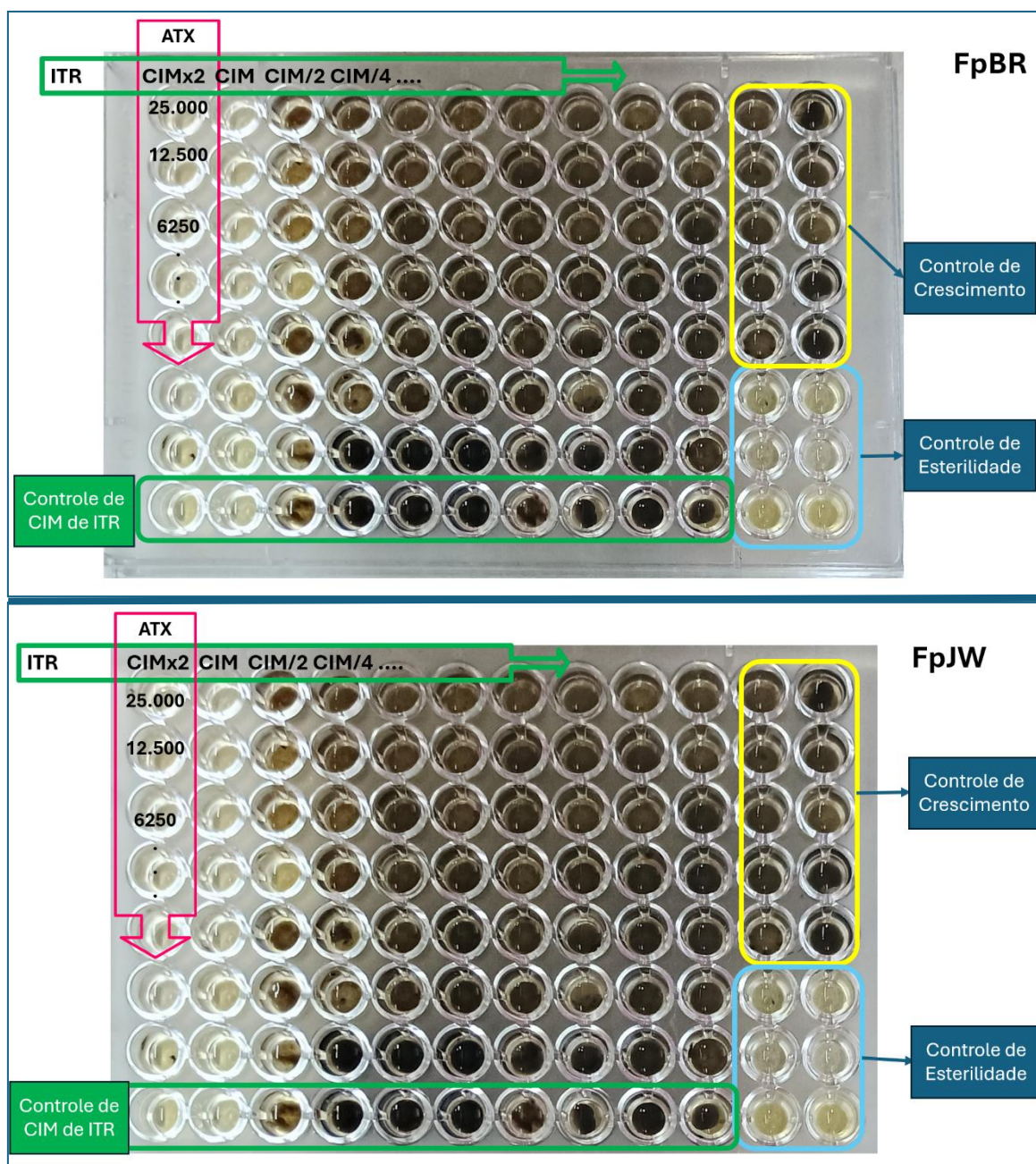


Figura 10. Placa de 96 poços com a combinação de ITR+ ATX para os isolados de *Fonsecaea pedrosoi*.

A partir da leitura das interações nas placas de 96 poços, determinou-se o valor da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) em que a associação de HQN + ITR teve efeito aditivo, em ambos os isolados de *Fonsecaea pedrosoi*. Para o ATX, devido ao alto valor de CIM, também não foi possível realizar o cálculo de ICIF. Além disso, quando ITR e HQN estão associados, a CIM de ambos os fármacos reduziu à metade da concentração inicial, ou seja, a CIM (100%) dos fármacos isolados. A Tabela 5 apresenta esses dados.

Tabela 5. Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) para a atividade in vitro da combinação de HQN com ITR contra *Fonsecaea pedrosoi*.

	CIM (µg/mL)		CIM Combinado (µg/mL)		ICIF	Interpretação
	HQN	ITRA	HQN	ITRA		
FpBR	780	0,5	390	0,25	1	ADITIVO
			390	0,125	0,75	ADITIVO
			390	0,0625	0,625	ADITIVO
			390	0,03125	0,5625	ADITIVO
FpJW	780	2	390	1	1	ADITIVO
			390	0,5	0,75	ADITIVO
			390	0,25	0,625	ADITIVO
			390	0,125	0,5625	ADITIVO
			390	0,0625	0,53125	ADITIVO

Nota: A razão ICIF é calculada para avaliar o efeito entre as drogas testadas. Considera-se efeito Sinérgico: $\Sigma FICI \leq 0,5$; Aditivo: $0,5 > \Sigma FICI \leq 1$; Indiferente: $1 > \Sigma FICI \leq 4,0$ e Antagônico: $\Sigma FICI > 4,0$.

A partir do teste de avaliação de clarificação das amostras em meio sólido, a HQN apresentou oxidação do fármaco, causando escurecimento do meio ágar batata. Não foi possível estabelecer com clareza se houve diminuição da melanina em comparação com o controle, em ambas as amostras, embora visualmente pareça haver diferença na coloração do próprio ágar entre as placas (Figura 11). Ao avaliar a coloração do ágar dos isolados, a placa contendo HQN na concentração de CIM é mais escura, amarronzada, em comparação com o ágar na concentração de CIM/2, e ainda mais claro na CIM/4, especialmente na amostra FpJW. Dessa forma, não é possível afirmar se a mudança da coloração do ágar corresponde somente à oxidação da HQN ou dispersão do pigmento melânico no meio.

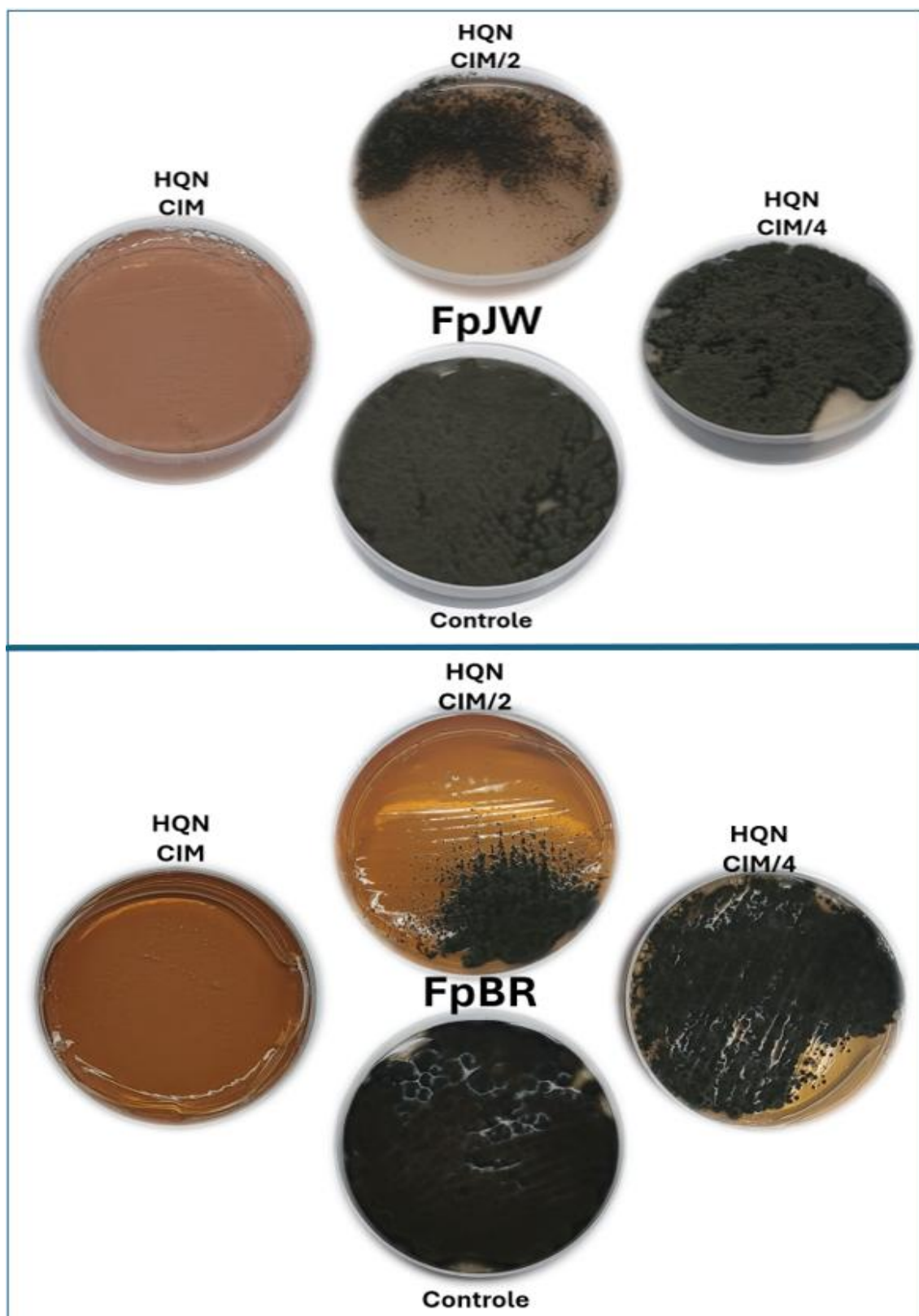


Figura 11. Teste de Clarificação da melanina com a Hidroquinona em ágar batata dextrose.
A) Isolado clínico FpJW; **B)** Isolado clínico FpBR; **HQN:** Hidroquinona; **CIM:** Concentração Inibitória Mínima

No meio líquido, a HQN também oxidou, deixando o meio RPMI amarronzado, não sendo possível avaliar se a coloração é devida a oxidação do fármaco ou de presença de melanina do fungo. Já o TCZ pareceu dissolver a melanina no meio líquido, escurecendo todo o meio. Quando avaliados em conjunto, ITR + HQN no meio líquido, nas duas combinações, também não foi possível avaliar redução pigmento devido ao escurecimento do meio pela oxidação da HQN, porém, chama a atenção que mesmo com ITR em concentração de CIM/32 e HQN na concentração da CIM/4 há visível redução importante de crescimento fúngico quando comparado ao controle, conforme Figura 12.

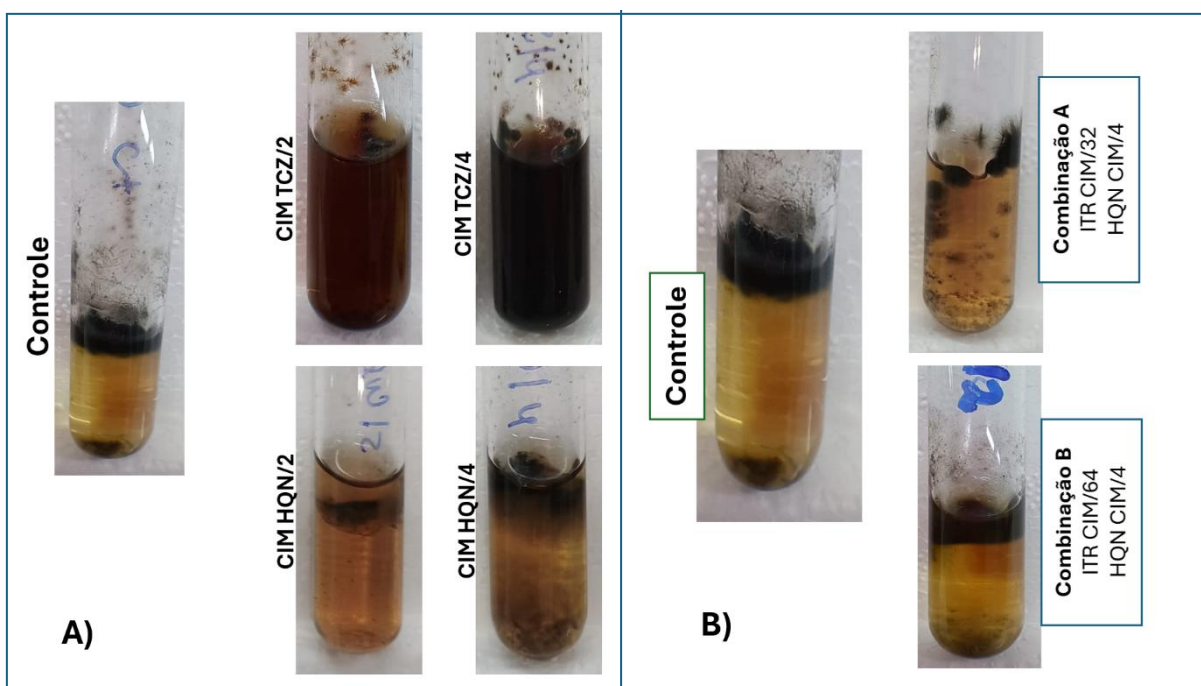


Figura 12. Teste de clarificação da melanina em meio líquido (RPMI).

A) Comparação do efeito da Hidroquinona com o Triciclazol; **B)** Combinação da Hidroquinona com o Itraconazol (Combinação A: ITR 0,062µg/mL + HQN 195µg/mL; Combinação B: ITR 0,031µg/mL + HQN 195µg/mL)

5.2 Teste in silico

A partir da avaliação de semelhança das estruturas químicas dos fármacos e da melanina, é possível observar a presença do radical hidroxila nos três fármacos, radical carbonila nos três fármacos e na melanina e radical amina no ATX e melanina, conforme a Figura 13. Todos esses radicais favorecem ligações entre as estruturas químicas.

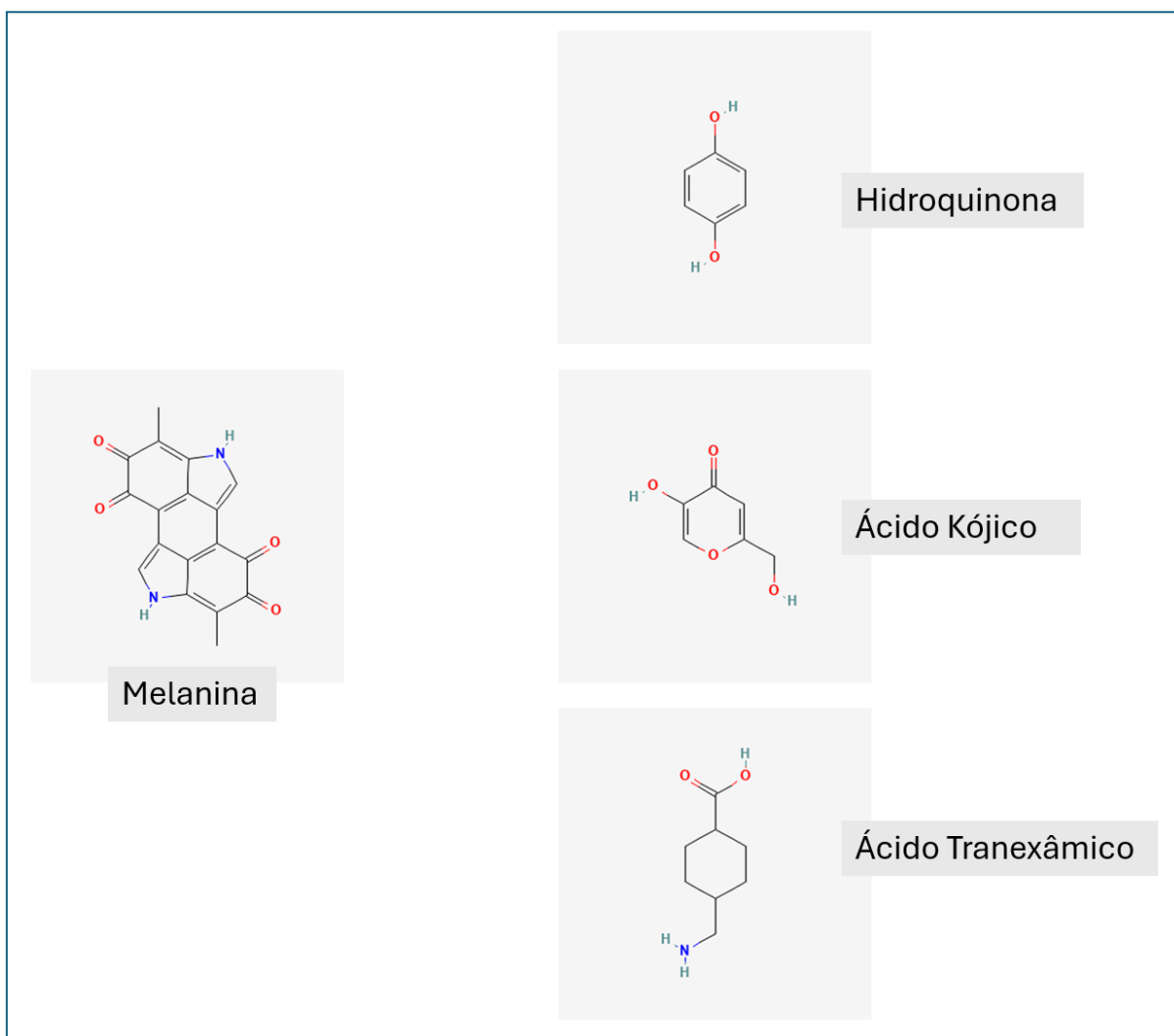


Figura 13. Estrutura química das moléculas evidenciando extremidades com possíveis interação entre a melanina e os fármacos estudados

Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6325610>
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/785>
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3840>
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5526>

O *docking* molecular identificou conformações de ligação ótimas entre os compostos testados e seus respectivos alvos (Figura 14A). Os resultados demonstraram que a ATX interage diretamente com a via de biossíntese da melanina, apresentando afinidade de ligação comparável à dos inibidores clássicos da tirosinase, HQN e KOJ.

A robustez dos achados foi confirmada por meio de análises de *redocking*, validando a precisão do algoritmo computacional na predição das poses moleculares. O menor valor de RMSD (0,74Å) foi observado para o alvo 2R24, associado à indol-5,6-quinona, um intermediário chave da via da L-DOPA que, sob ação da tirosinase, conduz à formação de eumelanina – o pigmento responsável pela coloração da pele, pelos e olhos. Em contraste, o maior RMSD foi verificado para o alvo-controle 5M8N (Figura 14B).

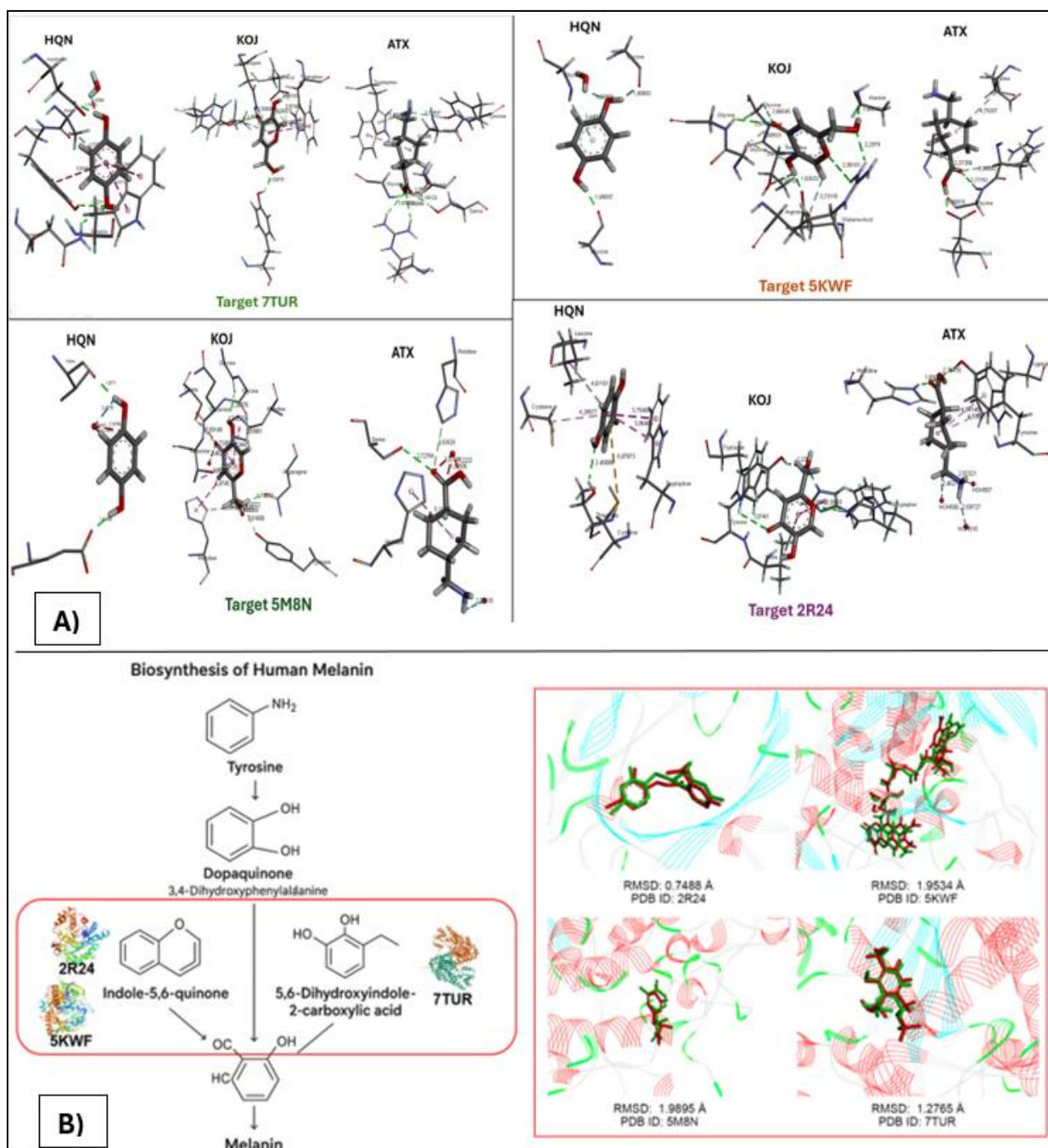


Figura 14. Representações tridimensionais do docking molecular das conformações de ligação entre os compostos e os alvos.

A) Os modelos 3D ilustram as poses de ligação previstas nos sítios ativos de cada proteína, demonstrando complementaridade espacial e orientação dos ligantes. **B)** Desempenho do *redocking* e fidelidade das poses dos compostos testados contra os alvos da melanogênese.

Nota: As estruturas em vermelho representam a conformação do ligante cristalográfico, enquanto as estruturas em verde correspondem à melhor pose de *docking* obtida no *redocking*.

Na presente análise, todas as interações composto-alvo apresentaram valores negativos de ΔG , indicando ligação espontânea em todas as condições testadas. O ATX demonstrou energias livres de ligação comparáveis às da HQN e KOJ para todos os alvos. Vale destacar que, na validação por *redocking*, O ATX apresentou valores de ΔG ainda mais negativos, reforçando seu potencial de interação molecular direta na via de biossíntese de melanina humana - particularmente com os alvos 2R24 e 5KWF, ambos associados ao intermediário oxidativo indol-5,6-quinona. A Figura 15, abaixo, apresenta o mapa de calor e o gráfico radar, ilustrando as afinidades de ligação e os perfis de interação entre os compostos testados e os alvos relacionados à melanogênese.

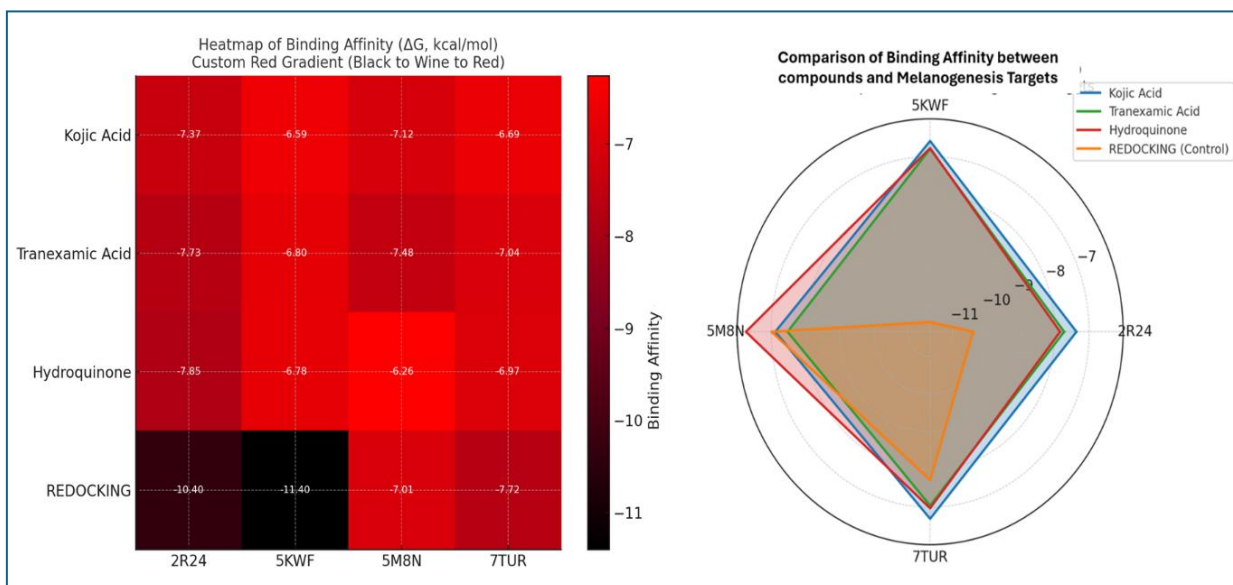


Figura 15. Perfis de afinidade molecular do Ácido Tranexâmico, Ácido Kójico e Hidroquinona com alvos da via de melanogênese.

A partir da ancoragem, ou docking molecular, são avaliadas as distâncias de ligação entre as moléculas e os aminoácidos e os tipos de ligações que ocorrem, sendo as ligações de hidrogênio e as covalentes as consideradas mais fortes. Além disso, é necessária a avaliação de quais aminoácidos apresentam ligação com o alvo e fármaco, essa etapa é essencial no sentido de aproximar a reação do teste *in silico* com o que ocorre no organismo. Dentre os aminoácidos, a tirosina é a que tem maior ligação com a produção da melanina no organismo e o alvo 7TUR é o que se ligou à tirosina, a partir de ligações de Hidrogênio em todos os fármacos, sugerindo que o ATX interfere na via de produção de melanina quando os valores são comparados à

HQN ao KOJ. Além disso, o ATX e o KOJ também se ligaram a partir de ligações de Hidrogênio com a tirosina quando o alvo é o 2R24. O alvo 5M8N liga-se através de H-OH, covalente, com todos os fármacos. Esses achados são ilustrados na Figura 16.

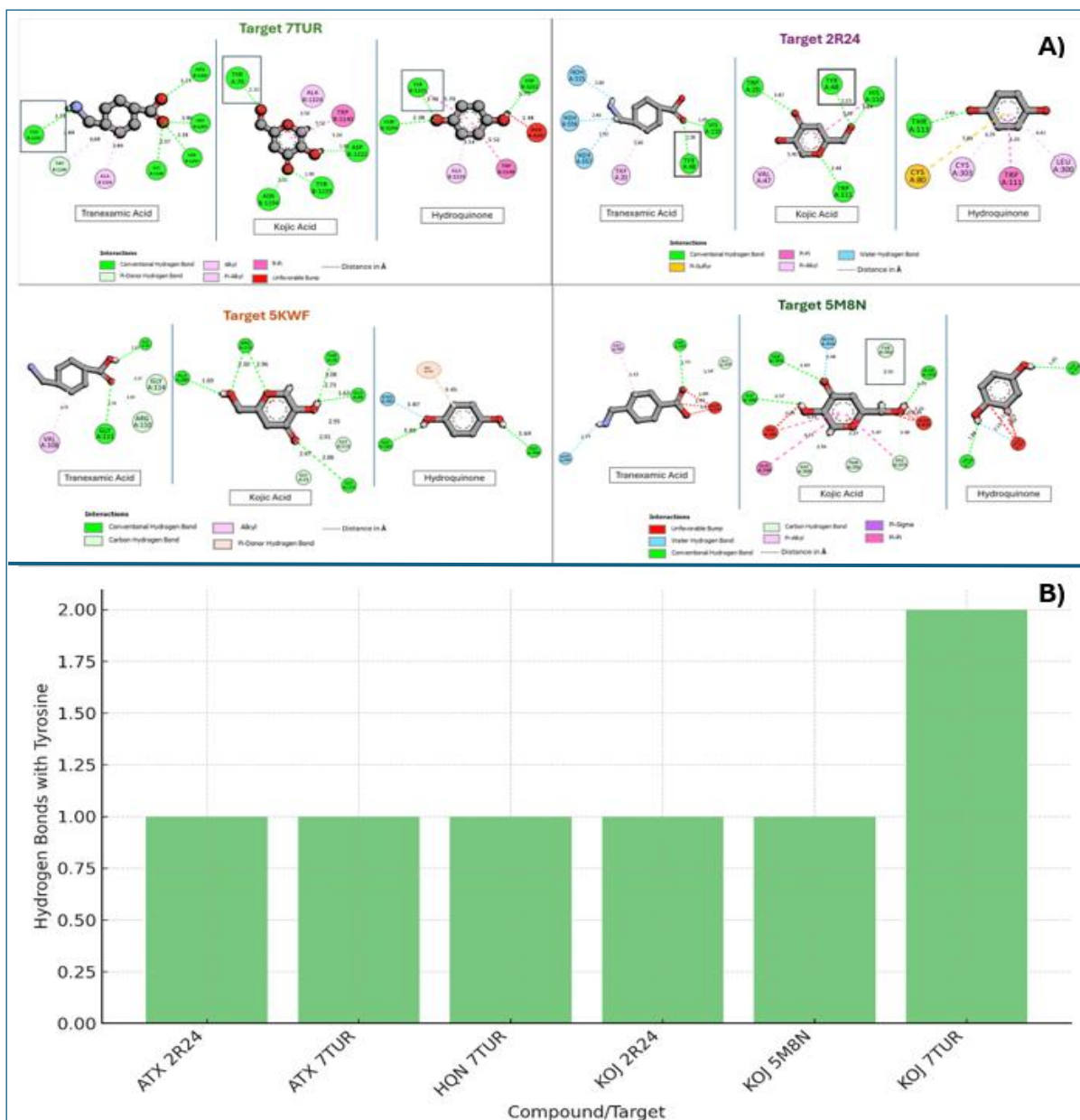


Figura 16. Tipos de ligações dos fármacos aos alvos e aminoácidos envolvidos.

A) Representação bidimensional das interações moleculares entre ligantes, alvos e resíduos de aminoácido com distância de ligação em Å, destacando-se as ligações de hidrogênio envolvendo tirosina. **B)** Frequência de ligações de hidrogênio envolvendo tirosina nos complexos composto-alvo.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a sensibilidade do fungo *Fonsecaea pedrosoi*, a partir de dois isolados clínicos, ao Itraconazol, Hidroquinona, Ácido Tranexâmico e ao fungicida agrícola Triciclazol. Os medicamentos testados neste estudo, apresentaram sensibilidade distinta ao ITR, apesar de ambos os pacientes apresentarem lesão grave. Apesar disso, o teste inovador com a Hidroquinona evidenciou que o fármaco apresenta efeito citotóxico sobre o fungo, com valor de CIM de 780µg/mL e inibição de 100% de crescimento dos isolados clínicos FpJW e FpBR. O ácido tranexâmico, entretanto, não apresentou inibição de crescimento fúngico, apesar das altas concentrações testadas. Quando os fármacos foram avaliados em combinação, a partir do método tabuleiro de xadrez, apesar de HQN e ITR apresentarem efeito aditivo pelo valor de referência da ICIF, foi possível observar que ambos os fármacos reduzem, pelo menos, à metade o valor da CIM para os mesmos isolados. Já para o ATX, por não ter tido valor de CIM, não foi possível determinar efeito da combinação. No teste de avaliação de branqueamento do *F. pedrosoi* a HQN apresentou oxidação em meio sólido e líquido, interferindo na leitura do resultado. O ATX, pareceu clarear a placa de 96 poços, nas concentrações testadas. Já para o teste *in silico*, as ligações e o acoplamento com os alvos realizados pelo ATX se assemelham aquelas realizadas pela HQN e Ácido Kójico, sugerindo fortemente uma ligação direta à via da melanina.

A Cromoblastomicose (CBM) é uma micose profunda de evolução crônica e resposta terapêutica frequentemente insatisfatória, exigindo, em muitos casos, a combinação de múltiplas abordagens terapêuticas (Queiroz-Telles e Santos, 2013). O ITR permanece como o principal antifúngico utilizado no tratamento da doença em nível mundial. Embora fármacos mais modernos da mesma classe, como isavuconazol, voriconazol e posaconazol, tenham demonstrado potencial terapêutico superior em estudos iniciais (Santos, Azevedo e Queiroz-Telles, 2025), sua disponibilidade é restrita, sobretudo em países de baixa e média renda. Soma-se a isso o fato de que o tratamento com ITR, apesar de ser o padrão atual, é de longa duração e envolve custos elevados, o que compromete a adesão terapêutica e o acesso em populações vulneráveis (Queiroz-Telles et al., 2017).

A CBM, é classificada como uma doença tropical negligenciada, categoria oficialmente reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 2017. Essa designação evidencia o histórico de invisibilidade da doença nos sistemas de saúde, nos programas de vigilância e na agenda de pesquisa global (WHO, 2021). A negligência se reflete também na escassez de estudos clínicos robustos, na limitação de financiamento para inovação terapêutica e na ausência de protocolos padronizados para o manejo da infecção. No entanto, a inclusão da CBM no rol de doenças tropicais negligenciadas pela OMS representa um avanço estratégico, pois amplia a visibilidade internacional sobre a sua importância epidemiológica (santos, 2025), pode estimular investimentos em pesquisa translacional e clínica, e favorecer o desenvolvimento de políticas públicas voltadas à prevenção, diagnóstico precoce e acesso ao tratamento. Nesse contexto, estudos que propõem novas abordagens terapêuticas, reposicionamento de fármacos e alternativas de baixo custo, como o presente trabalho, tornam-se particularmente relevantes para o enfrentamento efetivo dessa micose ainda subestimada.

Adicionalmente, diferentemente do que se observa para diversos agentes etiológicos bacterianos e fúngicos de importância médica, o perfil de sensibilidade dos fungos causadores da CBM ainda não está plenamente estabelecido. Protocolos amplamente reconhecidos para testes de suscetibilidade *in vitro*, como os desenvolvidos por organismos internacionais, como o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) e o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), bem como o protocolo brasileiro BRCast, apresentam diretrizes padronizadas e metodologias harmonizadas para determinação de concentrações inibitórias mínimas (CIMs). No entanto, a ausência de valores de referência específicos para fungos melanizados, em especial para o gênero *Fonsecaea*, dificultam a definição de condutas terapêuticas como um “padrão-ouro” (Queiroz-Telles e Santos, 2013).

Hellwig et al. (2019) conduziram uma revisão sistemática com o objetivo de avaliar a suscetibilidade dos agentes etiológicos da CBM e investigar o potencial sinergismo entre diferentes fármacos antifúngicos. A análise abrangeu 35 estudos, nos quais os isolados fúngicos foram considerados sensíveis quando apresentavam concentrações inibitórias mínimas (CIM) inferiores a 1 µg/mL. Mais recentemente,

Smith *et. al.* (2025) publicaram um estudo de referência no qual estabeleceram, pela primeira vez, o ponto de corte epidemiológico (*epidemiological cutoff value* – ECV) para *Fonsecaea pedrosoi*, com base na análise de suscetibilidade a oito diferentes antifúngicos, testados em 148 amostras clínicas. Este marco representa um avanço significativo na padronização dos testes *in vitro* de sensibilidade antifúngica para CBM, oferecendo parâmetros robustos que deverão orientar futuras pesquisas, além de subsidiar a atualização de protocolos nacionais e internacionais de microdiluição em caldo, conforme preconizado por instituições como o CLSI, EUCAST e BRCast. A importância desse estudo transcende o fato de ser o primeiro a definir um ECV para *F. pedrosoi*; reside, sobretudo, no valor epidemiológico desse parâmetro, que atua como ferramenta essencial de vigilância para a detecção precoce de possíveis fenótipos resistentes. Dessa forma, o ECV se consolida não apenas como critério técnico para interpretação laboratorial, mas também como instrumento estratégico para o monitoramento da eficácia terapêutica e para a orientação racional do uso de antifúngicos no manejo da Cromoblastomicose.

Estudos anteriores que investigaram a susceptibilidade de *Fonsecaea pedrosoi* ao ITR, embora com número reduzido de isolados, evidenciam uma ampla variação nos valores de CIM para esse antifúngico. Guevara *et. al.* (2022), avaliando 10 amostras clínicas, relataram CIMs variando entre 0,06 e 0,5µg/mL. Zheng *et. al.* (2019), por sua vez, observaram uma variação de 1 a 8µg/mL em nove isolados, enquanto Alves *et. al.* (2018), com cinco amostras, relataram CIMs entre 0,25 e 1µg/mL. De forma semelhante à literatura, os isolados clínicos utilizados no presente estudo — FpBR e FpJW — apresentaram CIMs distintas para o ITR: 0,5µg/mL e 2µg/mL, respectivamente. Com base no ECV recentemente estabelecidos por Smith *et. al.* (2025), que definem *Fonsecaea pedrosoi* como sensível ao ITR o ponto de corte de CIM = 0,5µg/mL, pode-se inferir que o isolado FpBR é sensível ao fármaco, enquanto FpJW demonstra perfil de resistência.

No que se refere à hidroquinona (HQN), não é possível estabelecer um ponto de corte de referência, uma vez que este composto não é tradicionalmente classificado como antifúngico, e, portanto, não há diretrizes padronizadas para interpretação da sua atividade *in vitro*. A mesma limitação se aplica ao TCZ, fármaco de uso agrícola, não aprovado para aplicação em humanos. No entanto, observa-se

que a HQN apresentou efeito citotóxico relevante sobre os dois isolados clínicos de *F. pedrosoi*, resultando em valores de CIM = 780µg/ml para ambos os isolados, mostrando ação citotóxica para o *F. pedrosoi*.

Diante dos desafios terapêuticos impostos pela CBM, é comum a adoção de abordagens terapêuticas combinadas, envolvendo a utilização de múltiplos fármacos ou a associação entre antifúngicos e outras modalidades de tratamento, como excisão cirúrgica, crioterapia ou fototerapia (Zhou *et. al.*, 2023; Ranawaka, 2021; Huang *et. al.*, 2019; Hu *et. al.*, 2015). Embora os estudos *in vitro* que avaliam a eficácia de combinações farmacológicas para o tratamento da CBM ainda sejam relativamente escassos (Ji *et. al.*, 2025; Coelho, Alves *et. al.*, 2022; Yu *et. al.*, 2008), a prática clínica frequentemente recorre à associação de antifúngicos sistêmicos, especialmente em casos de doença extensa, refratária ou recidivante. Essa estratégia visa potencializar a eficácia terapêutica, ampliar o espectro de ação, reduzir a dose isolada de cada agente e, possivelmente, retardar o surgimento de resistência. Assim, ainda que a base experimental sobre sinergismo farmacológico na CBM seja limitada, sua aplicação prática é amplamente reconhecida nos protocolos empíricos adotados em áreas endêmicas. Diante disso, o método tabuleiro de xadrez ou *checkerboard assay* é amplamente utilizado como forma de avaliar se fármacos distintos possuem atividade antagônica ou sinérgica em diversos micro-organismos *in vitro*.

No presente estudo, a associação do ITR com a HQN, avaliada pelo método tabuleiro de xadrez, resultou em uma variação dos valores de CIM entre 0,0625 e 1µg/mL para o isolado FpJW, e entre 0,3125 e 0,25µg/mL para o isolado FpBR. Esses resultados mostram uma redução nos valores de CIM quando comparados ao ITR utilizado isoladamente, sugerindo um efeito potencial da HQN como agente modulador da suscetibilidade fúngica. Na revisão sistemática conduzida por Hellwig *et. al.* (2019), foi avaliada a combinação entre ITR e Terbinafina (TRB), ambos antifúngicos clássicos, com resultados semelhantes: em oito isolados de *F. pedrosoi*, a CIM da associação variou entre 0,127 e 0,25µg/mL, indicando um perfil de sensibilidade próximo ao observado no presente estudo, mesmo que, neste caso, a HQN não seja tradicionalmente classificada como agente antifúngico.

Com base ECV propostos recentemente por Smith *et. al.* (2025), observou-se que o isolado FpJW, inicialmente classificado como resistente ao ITR isolado (CIM

= 2µg/mL), passou a apresentar valores dentro da faixa de sensibilidade em algumas das combinações com HQN. Apesar de a análise do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) ter indicado uma interação do tipo aditiva, e não sinérgica, a redução consistente das CIMs de ambos os fármacos na associação, em pelo menos 50% em relação ao uso isolado, é um achado relevante. Tais resultados fortalecem a hipótese desta tese de que a HQN pode atuar como agente adjuvante no tratamento da Cromoblastomicose, contribuindo para aumentar a eficácia do ITR. Pressupõe-se, ainda, que essa associação farmacológica possa permitir a redução do tempo de exposição ao antifúngico sistêmico, o que representa um avanço importante no enfrentamento da resistência e dos efeitos adversos associados ao tratamento prolongado da doença.

No presente estudo, a hidroquinona (HQN), mesmo utilizada de forma isolada, demonstrou efeito fungicida sobre ambos os isolados clínicos de *Fonsecaea pedrosoi*, conforme evidenciado pela razão entre a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM). Embora a HQN não seja classificada como antifúngico convencional, há relatos na literatura sobre sua atividade antimicrobiana, especialmente no que se refere à inibição da formação de biofilmes em *Vibrio* spp. e *Candida albicans* (Sathiyamoorthi *et. al*, 2023; Kim *et. al.*, 2022). Ainda que o mecanismo de ação da HQN sobre *F. pedrosoi* não esteja totalmente elucidado, dados preliminares sugerem que sua ação pode estar relacionada à interferência em componentes estruturais da parede celular. Nesse sentido, Pereira *et al.* (2022), ao investigarem os efeitos do ácido kójico — conhecido inibidor direto da tirosinase — em fungos do gênero *Fonsecaea*, observaram, *in vitro*, evidências de desorganização e ruptura da parede celular após inibição da melanogênese. Esses achados reforçam a plausibilidade de que compostos que atuam sobre a via de síntese da melanina, como a HQN, possam comprometer a integridade da parede fúngica e exercer efeito antifúngico direto, o que sustenta a proposta de seu uso como agente adjuvante no tratamento da Cromoblastomicose.

Soma-se a esses achados o fato de a HQN ser um fármaco de uso tópico, com histórico de aplicação segura na dermatologia humana, o que amplia suas possibilidades terapêuticas. Dada sua ação fungicida observada *in vitro*, é plausível considerar que a HQN possa ser empregada, de forma isolada, em casos clínicos

específicos, como em pacientes com contraindicação ao uso de itraconazol - fármaco de primeira escolha no tratamento da Cromoblastomicose - a exemplo daqueles com disfunções hepáticas ou outras comorbidades que limitem o uso de antifúngicos sistêmicos. Essa hipótese, ainda que careça de validação clínica, abre novas perspectivas para o manejo da doença, especialmente em contextos em que o tratamento convencional apresente restrições.

O mecanismo de ação descrito para a HQN baseia-se no bloqueio da tirosinase, enzima fundamental para a melanogênese. Trata-se de um agente amplamente utilizado no tratamento do melasma e de outros distúrbios hiperpigmentares (Lipsker e Lenormand, 2019; Nordlund, Grimes e Ortonne, 2006; Pazyar et al., 2019; Tehranchinia, Saghi e Rahimi, 2018). A segurança e a eficácia da HQN como despigmentante tópico já estão bem estabelecidas, com seu uso clínico remontando à década de 1960 (Searle, Al-Niaimi e Ali, 2021). Os efeitos adversos mais comumente relatados incluem irritação local e eritema. O efeito colateral mais grave, embora raro, é a ocronose exógena, um distúrbio paradoxal caracterizado pelo acúmulo de pigmento na epiderme, geralmente associado ao uso prolongado (superior a 12 meses) e a concentrações elevadas da HQN (acima de 5%) (Charlín et al., 2008; Ishack e Lipner, 2022), motivo pelo qual seu uso deve ser realizado sob supervisão médica.

Entretanto, é importante destacar que, no contexto da Cromoblastomicose, a ocorrência de ocronose pode não representar uma limitação clínica significativa. Ao contrário do que se observa no tratamento de afecções estéticas como o melasma, em que a hiperpigmentação residual é indesejada, os pacientes com CBM frequentemente já apresentam lesões crônicas extensas e alterações pigmentares persistentes, como cicatrizes atróficas e áreas hipocrômicas resultantes do processo inflamatório e do uso prolongado de antifúngicos sistêmicos, como o itraconazol. Dessa forma, a presença eventual de ocronose em áreas previamente acometidas pode não comprometer o resultado terapêutico e nem impactar negativamente a qualidade de vida do paciente. Essa consideração amplia a viabilidade do uso tópico da HQN em casos específicos da CBM, especialmente como alternativa em pacientes com contraindicações ao tratamento sistêmico.

Além disso, é importante ressaltar que a HQN é um fármaco de uso tópico, amplamente utilizado, geralmente nas concentrações de 1-4% (Banihashemi *et al.*, 2015; Farshi, 2011; Nordlund, Grimes e Ortonne, 2006; Pazyar *et al.*, 2019; Saki, Darayesh e Heiran, 2018; Tehranchinia, Saghi e Rahimi, 2018). No nosso país, a apresentação comercial mais comum é de 40mg/g (4%), concentração considerada segura pelos estudos. É um medicamento de baixo custo e disponível globalmente, oferecendo a possibilidade de uma alternativa econômica para o tratamento da Cromoblastomicose em associação aos antifúngicos sistêmicos, ou ainda, como opção isolada nos pacientes com contraindicações ao uso de ITR. Esse achado, portanto, é de extrema relevância, especialmente no momento de crescente preocupação com a resistência antifúngica, aventando uma possível alternativa para tratamento.

Ao avaliar a capacidade de branqueamento no fungo pelas drogas, a partir da hipótese que o mesmo efeito encontrado em seres humanos pudesse ocorrer para o fungo, a HQN oxidou, tanto em meio líquido quanto em meio sólido, deixando o ágar amarronzado, interferindo na leitura comparativa com o controle. A melanina, em humanos e fungos demáceos, já está estabelecida como importante fator de proteção (Brenner e Hearing, 2008; Mora-Montes *et al.*, 2022) e modelos animais já foram sugeridos como alternativas para avaliação da melanogênese, como o peixe-zebra (Ferreira *et al.*, 2023). A presença de melanina na pele humana consegue bloquear a profundidade que os raios UV atingem a pele, produzindo menor índice de queimaduras (Marionnet, Tricaud e Bernerd, 2015). E recentes estudos, sugerem que a melanina de fungos possa ser alvo de estudos para possível uso como protetor solar (Oh *et al.*, 2021) e mesmo como bloqueadores da melanogênese em humanos (Silva Sena *et al.*, 2023), sendo possível alternativa para tratamento de distúrbios pigmentares.

Ao avaliarmos os achados do teste *in silico*, que buscou evidenciar a ação do ATX na via de síntese da melanina humana, uma vez que o fármaco é antifibrinolítico e está sendo utilizado amplamente para o tratamento do Melasma com efeito clareador, os resultados do *docking* encontrados fornecem novas perspectivas mecanísticas sobre o papel da ATX na biossíntese da melanina. Embora tradicionalmente considerada um agente adjuvante no Melasma, com propriedades

anti-inflamatórias e antiangiogênicas, o ATX demonstrou potencial de ligação direta a alvos melanogênicos, com níveis de afinidade comparáveis aos do KOJ e da HQN — dois bloqueadores diretos da tirosinase. Vale destacar que a formação consistente de ligações de hidrogênio com resíduos de tirosina nos alvos 7TUR e 2R24 sugere um possível efeito inibitório sobre etapas oxidativas no interior dos melanossomos, contribuindo, assim, para sua atividade despigmentante por meio de um mecanismo molecular anteriormente pouco explorado.

Melasma é uma desordem hiperpigmentar crônica reconhecida como uma condição clinicamente desafiadora para dermatologistas e pacientes (Artzi *et al.*, 2021), e atualmente está bem estabelecido que a radiação ultravioleta (UV), em combinação com complexas interações dermoepidérmicas, predisposição genética e influências hormonais, contribuem para o desenvolvimento desta condição dermatológica multifatorial (Sarkar, Bansal e Ailawadi, 2020). A avaliação clínica mediante o Melasma Area and Severity Index (MASI), instrumento consagrado para mensuração de resposta terapêutica, demonstra variabilidade significativa em seus resultados conforme o tratamento utilizado (Farshi, 2011; Rosario, Del *et al.*, 2017). E, atualmente, dispõe-se de uma ampla gama de agentes farmacológicos e abordagens terapêuticas, incluindo microagulhamento com ou sem “drug delivery”, formulações tópicas e tratamentos sistêmicos (Banihashemi *et al.*, 2015; Farshi, 2011; Malik, Hanif e Mustafa, 2019; Saki, Darayesh e Heiran, 2018; Sarkar *et al.*, 2002).

O ATX é um fármaco consolidado e amplamente utilizado em pós-operatório, procedimentos ortopédicos e, inclusive, em cuidados pré-hospitalares por seu efeito primário como antifibrinolítico (Chen *et al.*, 2019; Gruen *et al.*, 2023; Picetti *et al.*, 2019). Entretanto, no contexto do Melasma - embora considerada uma indicação *off-label* – o ATX tem sido associado a mecanismos de ação indiretos, incluindo a modulação da via plasmina-plasminogênio, a regulação da angiogênese e efeitos anti-inflamatórios, como a redução do eritema, por exemplo (Kim *et al.*, 2016; Neagu *et al.*, 2022). Como resultado, sua utilização na prática dermatológica vem sendo crescentemente documentada como uma estratégia adjuvante eficaz na otimização dos desfechos terapêuticos, tanto na administração sistêmica oral quanto nas técnicas de microagulhamento (Wali e Parwani, 2019). Apesar de seu caráter *off-label* e dos desfechos clínicos encorajadores, a literatura atual carece de evidências

robustas que comprovem um efeito direto do ATX sobre a síntese da melanina. Se o efeito branqueador encontrado em humanos também ocorrer nos fungos e, dessa forma, reduzir a virulência do fungo, torna-se também, opção de tratamento da CBM.

A análise do mapa de calor, que ilustra as energias de ligação das interações moleculares, revelou que o ATX apresentou magnitudes de ligação comparáveis às da HQN e KOJ nos mesmos alvos. Soma-se a isso que os fármacos apresentaram ligações de hidrogênio, quimicamente estáveis, com frequência semelhantes entre si, além de haver ligação direta do ATX à tirosina, aminoácido fundamental para a síntese de melanina, tal qual HQN e KOJ. Esses achados reforçam a hipótese de que o ATX pode exercer um efeito direto na biossíntese de melanina, além dos mecanismos indiretos propostos e bem documentados na literatura.

Adicionalmente, os controles experimentais de redocking confirmaram a reprodutibilidade e robustez metodológica empregada, validando definitivamente os achados computacionais. Os padrões de afinidade molecular observados sustentam a hipótese de que o ATX apresenta um perfil de interação análogo ao KOJ e HQN, inibidores clássicos da tirosinase. Estes achados elucidam novos mecanismos de ação do ATX na melanogênese, porém, como derivam exclusivamente de modelagem computacional, exigem validação experimental. As limitações inerentes ao docking - como a simplificação da dinâmica molecular - ressaltam a necessidade de estudos complementares combinando dinâmica molecular avançada, ensaios bioquímicos e modelos animais para confirmação fisiológica. Entretanto, representa um avanço significativo no campo, já que investigações anteriores sobre o ATX não haviam elucidado seu possível mecanismo de ação direta na melanogênese, e, associado aos resultados encontrados na prática clínica e já relatados na literatura, sustenta a manutenção do uso para tratamento do Melasma. Para a CBM, são necessários mais estudos que demonstrem a ação desse fármaco na melanina fúngica, uma vez que no nosso estudo *in vitro* não foi possível concluir o efeito clareador.

Diante dos achados, torna-se relevante considerar o resultado encontrado *in vitro* tanto para a ação isolada da Hidroquinona, com efeito fungicida, quanto na combinação com o ITR. Possivelmente a HQN possa ser um adjuvante no tratamento

da CBM, associado ao ITR. Supõem-se que, através da ação combinada, tendo a HQN como adjuvante, seja possível reduzir o tempo de tratamento, com um fármaco de uso tópico, de custo baixo e com poucos efeitos colaterais. Nesse sentido, torna-se necessária a realização de estudos clínicos para confirmação dos achados e, então, referenciar este protocolo de tratamento para utilização mundial. Além disso, sugere-se, também, que outros estudos sejam realizados no intuito de melhorar o entendimento quanto ao mecanismo de ação da HQN nos fungos. A avaliação de virulência, fagocitose e efeito direto da célula fúngica, não realizados nesse estudo por limitação de estrutura e recursos, será fundamental para sugerir o reposicionamento desta droga no mercado. Em relação ao ATX, até o momento, é possível concluir que a simulação *in vitro*, foi capaz de comparar o mecanismo de ação ao KOJ e à HQN. Somando-se aos resultados clínicos e às publicações atuais, os achados deste estudo sugerem que o ATX possa ser mantido como opção terapêutica no tratamento do Melasma, porém, para CBM, ainda são necessário novos testes.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, o presente estudo *in vitro* demonstrou que a hidroquinona (HQN) apresenta efeito citotóxico relevante sobre ambos os isolados clínicos de *Fonsecaea pedrosoi*, conforme evidenciado pelos valores de concentração inibitória mínima (CIM), mesmo não sendo um fármaco originalmente indicado para uso antifúngico. Esses achados indicam o potencial da HQN como uma nova alternativa terapêutica para a Cromoblastomicose (CBM), com possíveis aplicações futuras também em outras micoses. Embora não tenha sido possível confirmar, neste estudo, a ação despigmentante da HQN nos isolados de *F. pedrosoi*, o efeito fungicida observado sugere uma nova função farmacológica para essa molécula, reforçando a hipótese de seu reposicionamento.

Além disso, a avaliação da associação entre HQN e itraconazol (ITR) revelou um efeito aditivo nas diferentes concentrações testadas, o que evidencia a possibilidade de utilização da HQN como agente adjuvante ao tratamento antifúngico convencional. Essa combinação poderá representar uma estratégia terapêutica promissora, especialmente em casos refratários, em pacientes com contraindicações ao uso prolongado de antifúngicos sistêmicos, ou ainda como forma de reduzir o tempo de exposição ao ITR. Assim, este estudo amplia a compreensão sobre o potencial terapêutico da HQN e abre caminho para investigações clínicas futuras que possam validar seu uso isolado ou associado no manejo da Cromoblastomicose.

Adicionalmente, no ensaio de clarificação da melanina, observou-se que o tubo contendo HQN na concentração de $\frac{1}{4}$ da CIM associada ao ITR em $\frac{1}{32}$ da CIM apresentou redução do crescimento de *Fonsecaea pedrosoi* quando comparado ao tubo controle, sugerindo uma ação combinada mesmo em concentrações subinibitórias. Embora sejam necessários ensaios clínicos para validar a eficácia terapêutica desses achados *in vivo*, é relevante destacar a originalidade dos resultados, que propõem uma nova perspectiva terapêutica para a Cromoblastomicose. A HQN, portanto, apresenta-se como um fármaco com vantagens significativas: ampla disponibilidade no mercado, baixo custo, aplicação tópica, perfil de segurança bem estabelecido e raros efeitos adversos quando utilizada sob supervisão adequada. Tais características ampliam sua viabilidade no contexto clínico,

particularmente como agente adjuvante ao Itraconazol, ou mesmo como alternativa isolada em pacientes com contraindicações ao uso de antifúngicos sistêmicos, como aqueles com disfunções hepáticas. Além disso, é plausível supor que o uso combinado da HQN com o ITR possa contribuir para a redução do tempo total de tratamento, o que traria benefícios não apenas clínicos, mas também econômicos e sociais, especialmente em áreas endêmicas. Considerando que a HQN é um fármaco já aprovado para uso humano e com toxicidade previamente estudada, os dados obtidos nesta pesquisa oferecem uma base sólida para a realização de estudos clínicos imediatos que possam confirmar sua aplicabilidade no manejo da Cromoblastomicose.

Já para o ATX, não foi possível encontrar valor de CIM, pois em todas as concentrações testadas não houve 100% de inibição de crescimento fúngico. Além disso, o efeito branqueador encontrado em humanos, não foi encontrado para o fungo nas concentrações testadas, contrariando a hipótese do estudo para este fármaco. Entretanto, a partir do teste *in silico*, foi possível evidenciar que o ATX possa agir diretamente na via de síntese de melanina, com efeitos semelhantes aos encontrados na Hidroquinona e no Ácido Kójico, dois fármacos com função de bloqueio de tirosinase já estabelecidos. O ATX realizou ligações, *in silico*, diretamente no aminoácido tirosina, assim como a HQN e o KOJ com semelhantes distância, força e qualidade de ligações. Estes achados, embora necessitem de outros testes, como a dinâmica molecular, por exemplo, para confirmação dos efeitos encontrados na dockagem e redockagem, dão suporte para a manutenção do uso do ATX como tratamento do Melasma, reforçando os efeitos clínicos de clareamento/branqueamento das lesões já amplamente reportados na literatura.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Após os resultados encontrados nesse estudo tem-se como perspectivas futuras a conclusão da revisão de escopo: **“The variation in the minimum inhibitory concentration (MIC) of antifungals used in the treatment of Chromoblastomycosis (CBM)”** já registrada no OSFhome sob o identificador: [10.17605/OSF.IO/KG3SD](https://doi.org/10.17605/OSF.IO/KG3SD); além do *Brief Case*: **Chromoblastomycosis - tratamento com Itraconazol e Imiquimode em paciente com Lupus Cutâneo subagudo**, que aguarda finalização do teste *in vitro* para avaliação da CIM e posterior tradução para ser submetido a ASM Journals – Journal of clinical Microbiology. Os artigos **Hidroquinona como antifúngico e Hidroquinona, uma opção de tratamento adjuvante em Cromoblastomicose?** estão em redação inicial.

9. REFERÊNCIAS

- AGU, P. C. *et al.* Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Scientific Reports* |, v. 13, p. 13398, 2023.
- AJELLO, L. *et al.* Mycological Society of America A Case of Phaeohyphomycosis Caused by a New Species of *Phialophora*. Source: *Mycologia*, v. 66, n. 3, p. 490–498, 1974.
- ALVES COELHO, R. *et al.* Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of clinical strains of *Fonsecaea* spp. isolated from patients with chromoblastomycosis in Rio de Janeiro, Brazil. *PLOS Neglected Tropical Disease*, n. 7, 26 jul. 2018.
- ANDRADE, T. S. *et al.* Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses*, v. 47, p. 216–221, 2004.
- APTE, M. *et al.* 3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine-derived melanin from *Yarrowia lipolytica* mediates the synthesis of silver and gold nanostructures. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 11, n. 1, 30 jan. 2013.
- ARAÚJO, D. P. Avaliação da suscetibilidade in vitro de *Fonsecaea* spp a diferentes antifúngicos e análise das concentrações plasmáticas de itraconazol e hidroxitraconazol em pacientes com cromoblastomicose na região amazônica. Belém: Universidade Federal do Pará, 2015.
- ARIANI, T.; RIZAL, Y.; LEDIKA VEROCI, R. Clinical and mycological spectrum of chromoblastomycosis. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*, v. 33, n. 4, p. 1750–1761, 2023.
- ARTZI, O. *et al.* The pathogenesis of melasma and implications for treatment. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 20, n. 11, p. 3432–3445, 1 nov. 2021.
- AVELAR-PIRES, C. *et al.* Revisiting the clinical and histopathological aspects of patients with chromoblastomycosis from the brazilian amazon region. *Archives of Medical Research*, v. 44, n. 4, p. 302–306, maio 2013.
- AZEVEDO, C. M. P. S. *et al.* Squamous cell carcinoma derived from chronic chromoblastomycosis in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, v. 60, n. 10, p. 1500–1504, 15 maio 2015.
- AZEVEDO, C. M. P. S. DE *et al.* *Fonsecaea pugnacius*, a novel agent of disseminated chromoblastomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 53, n. 8, p. 2674–2685, 2015.
- BANIHASHEMI, M. *et al.* Comparison of therapeutic effects of liposomal Tranexamic Acid and conventional Hydroquinone on melasma. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 14, p. 174–177, maio 2015.

BOCCA, A. L. *et al.* Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: A role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia*, v. 161, n. 4, p. 195–203, abr. 2006.

BONIFAZ, A.; CARRASCO-GERARD, E.; SAUL, A. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses*, v. 44, p. 1–7, 2001.

BORGES, J. R. *et al.* Accuracy of direct examinations and culture as compared to the anatomopathological examination for the diagnosis of Chromoblastomycosis: a systematic review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 97, n. 4, p. 424–434, 25 maio 2022.

BRAI, A. *et al.* Progress Towards Adjuvant Development: Focus on Antiviral Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 9225, 25 de maio de 2023.

BRENNER, M.; HEARING, V. J. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *National Institute of Health*, v. 84, n. 3, p. 539–549, 2008.

BRITO, A. , C.; BITTENCOURT, M. J. S. Chromoblastomycosis: an etiological, epidemiological, clinical, diagnostic, and treatment update. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 93, n. 4, p. 495–506, 2018.

CALDWELL, G. W. In silico tools used for compound selection during target-based drug discovery and development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 10, n. 8, p. 901–923, 1 ago. 2015.

CALIGIORNE, R. B. *et al.* Fungos negros que afetam animais, plantas e o homem. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, p. 21–25, 2019.

CASSIANO, D. P. *et al.* Update on Melasma-Part II: Treatment. *Dermatol Ther (Heidelb)*, v. 12, p. 1989–2012, 29 jul. 2022.

CHARLÍN, R. *et al.* Hydroquinone-induced exogenous ochronosis_ a report of four cases and usefulness of dermoscopy. *International Journal of Dermatology*, v. 47, p. 19–23, 2008.

CHATTERJEE, S. *et al.* Solid-state NMR Reveals Carbon-based Molecular Architecture of *Cryptococcus neoformans* Fungal Eumelanins in the Cell Wall. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 22, 2015.

CHEN, F. *et al.* Efficacy and safety of perioperative tranexamic acid in elderly patients undergoing trochanteric fracture surgery: A randomised controlled trial. *Hong Kong Medical Journal*, v. 25, n. 2, p. 120–126, 1 abr. 2019.

CHO, Y. H. *et al.* Tranexamic acid inhibits melanogenesis by activating the autophagy system in cultured melanoma cells. *Journal of Dermatological Science*, v. 88, n. 1, p. 96–102, 1 out. 2017.

CHONGKAE, S. *et al.* Production of melanin pigments in saprophytic fungi in vitro and during infection. *Journal of Basic Microbiology*, v. 59, n. 11, p. 1092–1104, 1 nov. 2019.

COELHO, R. A.; ALVES, G. M.; *et al.* New possibilities for chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis treatment: identification of two compounds from the MMV Pathogen Box® that present synergism with itraconazole. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 117, 2022.

COELHO, R. A. *et al.* Does DHN-Melanin Always Protect Fungi against Antifungal Drugs The Fonsecaea_Micafungin Paradigm Enhanced Reader. v. 13, p. 201–209, 6 maio 2022.

CONSORTIUM, W. Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure. *Nucleic Acids Research*, v. 47, out. 2018.

CORDERO, R. J. B.; CASADEVALL, A. Functions of fungal melanin beyond virulence Fungal Biology Reviews Elsevier Ltda, 1 mar. 2017.

CORREIA, R. T. M. *et al.* Cromoblastomicose: relato de 27 casos e revisão de literatura. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 85, n. 4, p. 448–54, 2010.

DADACHOVA, E. *et al.* Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PLoS ONE*, v. 2, n. 5, 23 maio 2007.

D'MELLO, S. A. N. *et al.* Molecular Sciences Signaling Pathways in Melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, 2016.

EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, n. 3, p. 931–940, fev. 2012.

FARSHI, S. Comparative study of therapeutic effects of 20% azelaic acid and hydroquinone 4% cream in the treatment of melasma. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 10, p. 282–287, 2011.

FERNANDEZ, C. W.; KOIDE, R. T. The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. *Fungal Ecology*, v. 6, n. 6, p. 479–486, dez. 2013.

FERREIRA, A. M. *et al.* Anti-Melanogenic Potential of Natural and Synthetic Substances: Application in Zebrafish Model. *Molecules*, v. 28, 20 jan. 2023.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integração de técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios desafios em P&D de fármacos. *Quim. Nova.*, n. 10, p. 1770–778, 2 jun. 2011.

GE, W. *et al.* Exploring the therapeutic mechanisms and prognostic targets of Biochanin A in glioblastoma via integrated computational analysis and in vitro experiments. *Scientific Reports*, v. 14, p. 3783, 2024.

GESSLES, N.; EGOROVA, A.; BELOZERSKAYA, T. Melanin Pigments of Fungi under Extreme Environmental Conditions (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 50, n. 2, p. 125–134, 2014.

GÓMEZ-LÓPEZ, A. *et al.* In vitro evaluation of combination of terbinafine with itraconazole or amphotericin B against Zygomycota. *Mycology*, v. 45, p. 199–202, 2003.

GRIMES, P. E. *et al.* New oral and topical approaches for the treatment of melasma. *International Journal of Women's Dermatology*, v. 5, n. 1, p. 30–36, 1 fev. 2019.

GRIMES, P. E.; CALLENDER, V. D. Melasma: Management. 2019. Disponível em: <www.uptodate.com>.

GRUEN, R. L. *et al.* Prehospital Tranexamic Acid for Severe Trauma. *New England Journal*, 14 jun. 2023.

GUEDES, I. A. *et al.* Drug design and repurposing with DockThor-VS web server focusing on SARS-CoV-2 therapeutic targets and their non-synonym variants. *Nature Scientific Reports*, v. 11, n. 5543, 2021.

GUEVARA, A. *et al.* Molecular epidemiology and clinical-laboratory aspects of chromoblastomycosis in Mato Grosso, Brazil. *Mycoses*, v. 65, p. 1146–1158, 9 jul. 2022.

HAMMERSCHMIDT, M. *et al.* Avaliação dos métodos de classificação do melasma de acordo com a resposta ao tratamento. *Surg Cosmet Dermatol*, v. 4(2), p. 155–158, 2012.

HELLWIG, A. H. DA S. *et al.* In vitro susceptibility of chromoblastomycosis agents to antifungal drugs: A systematic review. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 16, p. 108–114, 25 set. 2019.

HERMAN, T. S. *et al.* CARD9 mutations and T cell immune response in patients with Chromoblastomycosis. n. 1, p. 14–23, 2024.

HU, Y. *et al.* Photodynamic Therapy Combined with Terbinafine Against Chromoblastomycosis and the Effect of PDT on *Fonsecaea monophora* in vitro. *Mycopathologia*, v. 179, n. 1–2, p. 103–109, 1 fev. 2015.

HUANG, X. *et al.* Successful treatment of chromoblastomycosis using ALA-PDT in a patient with leukopenia. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 26, p. 13–14, 1 jun. 2019.

ISHACK, S.; LIPNER, S. R. Exogenous ochronosis associated with hydroquinone: a systematic review *International Journal of Dermatology* John Wiley and Sons Inc, , 1 jun. 2022.

IWATSU, T.; TAKANO, M.; OKAMOTO SHOJI. Auricular Chromomycosis. *Arch Dermatol*, v. 119, 1983.

JANUSZ, G. *et al.* Molecular Sciences Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, n. 966, 31 jan. 2020.

JI, Y. *et al.* Antifungal Susceptibility of Melanized Fungi Isolated from CARD9 Deficient Patients: Implications for Treatment of Refractory Infections. *Mycopathologia*, v. 190, n. 29, 13 fev. 2025.

JOLY-TONETTI, N. *et al.* Melanin fate in the human epidermis: a reassessment of how best to detect and analyze histologically. *Experimental Dermatology*, v. 25, p. 501–504, 2016.

KAMEL BOULOS, M. N.; ZHANG, P. Personalized Medicine Digital Twins: From Personalized Medicine to Precision Public Health. *Public Health. J. Pers. Med*, 2021.

KIM, H. J. *et al.* Efficacy and safety of tranexamic acid in melasma: A meta-analysis and systematic review *Acta Dermato-Venereologica Medical Journals/Acta D-V*, 2017.

KIM, S. J. *et al.* Efficacy and possible mechanisms of topical tranexamic acid in melasma. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 41, n. 5, p. 480–485, 1 jul. 2016.

KIM, Y.-G. *et al.* Hydroquinones Including Tetrachlorohydroquinone Inhibit *Candida albicans* Biofilm Formation by Repressing Hyphae-Related Genes. *Microbiology Spectrum*, v. 10, n. 5, 2022.

KOMURA, H.; WATANABE, R.; MIZUGUCHI, K. The Trends and Future Prospective of *in silico* Models from the Viewpoint of ADME Evaluation in Drug Discovery. *Pharmaceutics*, v. 15, 12 nov. 2023.

KOSAKA KAJISHIMA, A. Estudo da Biogênese dos Melanossomas e o Controle da Síntese da Melanina pelo Inibidor Triciclazol nos fungos *Demáceos Fonsecaea pedrosoi* e *Wangiella dermatitidis*. 2009. Trabalho de Conclusão e Curso – Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro. 2009

KRZYŚCIAK, P. M.; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, M.; PIASZCZYŃSKI, M. Chromoblastomycosis. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, v. 31, n. 5, p. 310–321, 1 out. 2014.

KUTTER, A. P. N. *et al.* Effect of 50 mg/kg intravenous tranexamic acid on coagulation assessed by rotational thromboelastometry (ROTEM) in healthy beagle dogs. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, v. 161, n. 6, p. 369–376, 2019.

LEE, H. C.; THNG, T. G. S.; GOH, C. L. Oral tranexamic acid (TA) in the treatment of melasma: A retrospective analysis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 75, n. 2, p. 385–392, 1 ago. 2016.

LEE, K. C. *et al.* A case of phaeohyphomycosis caused by *exophiala lecanii-corni* *Annals of Dermatology Korean Dermatological Association*, 1 jun. 2016.

LIMBERGUER, T. N. J. Uma Abordagem Sobre A Hidroquinona No Tratamento De Hiperpigmentação. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Educação e Meio Ambiente. Ariquemes, Rondônia, 2015.

LIPSKER, H. D.; LENORMAND, C. Hyperpigmentations. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*, v. 12, n. 2, p. 666–682, 2019.

LIU, S. Fungal Melanin and the Mammalian Immune System. *Journal of Fungi*, v.7, n. 264, 31 de março de 2021.

MAEDA, K. Mechanism of Action of Topical Tranexamic Acid in the Treatment of Melasma and Mechanism of Action of Topical Tranexamic Acid in the Treatment of Melasma and Sun-Induced Skin Hyperpigmentation. *Cosmetics*, v. 9, n. 108, 19 out. 2022.

MAHMOUD, B. H. *et al.* Impact of Long-Wavelength UVA and Visible Light on Melanocompetent Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 130, p. 2092–2097, 2010.

MALIK, F.; HANIF, M. M.; MUSTAFA, G. Combination of Oral Tranexamic Acid with Topical 3% Tranexamic Acid versus Oral Tranexamic Acid with Topical 20% Azelaic Acid in the Treatment of Melasma. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, v. 39, n. 6, p. 502–504, 2019.

MANDAL, P. *et al.* Differences in The Cell Wall Architecture Of Melanin Lacking And Melanin Producing *Cryptococcus Neoformans* Clinical Isolates From India: An Electron Microscopic Study. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 662–666, 2007.

MARIONNET, C.; TRICAUD, C.; BERNERD, F. Exposure to non-extreme solar UV daylight: Spectral characterization, effects on skin and photoprotection. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 1, p. 68–90, 23 dez. 2015.

MAUBON, D. *et al.* Molecular Diagnosis of Two Major Implantation Mycoses: Chromoblastomycosis and Sporotrichosis. v. 8, n. 382, 9 abr. 2022.

MEDINA, R. *et al.* Identification of an intermediate for 1,8-dihydroxynaphthalene-melanin synthesis in a race-2 isolate of *Fulvia fulva* (syn. *Cladosporium fulvum*). *Cladosporium fulvum*). *Heliyon*, v. 4, p. 1036, 2018.

MERCADO-JUÁREZ, K. E. *et al.* Identification of SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors Using Chemical Similarity Analysis Combined with Machine Learning 2024. v. 17, 2 fev. 2024.

MIOT, L. D. B. *et al.* Fisiopatologia do melasma * Physiopathology of melasma. *An Bras Dermatol*, v. 84, n. 6, p. 623–635, 2009.

MORA-MONTES, M. *et al.* Does DHN-Melanin Always Protect Fungi against Antifungal Drugs? The Fonsecaaea/Micafungin Paradigm. *Microbiol. Res*, v. 2022, p. 201–209, 2022.

NAJAFZADEH, M. J. *et al.* Identification of chromoblastomycosis agents by PCR based reverse line blot (PCR-RLB) hybridization assay. *Microbial Pathogenesis*, v. 125, p. 43–47, 1 dez. 2018.

NEAGU, N. *et al.* Melasma treatment: a systematic review. *Journal of Dermatological Treatment*, v. 33, n. 4, p. 1816–1837, abr. 2022.

NOGUEIRA, M. N.; FERREIRA, L. A. A eficácia do ácido tranexâmico tópico no tratamento do melasma: evidências clínicas. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 17, n. 2, p. 236, 27 nov. 2018.

NORDLUND, J. J.; GRIMES, P. E.; ORTONNE, J. P. The safety of hydroquinone. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 20, n. 7, p. 781–787, ago. 2006.

NOSANCHUK, J. D.; STARK, R. E.; CASADEVALL, A. Fungal melanin: What do we know about structure? *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. DEC, 2015.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* Oxford University Press, , 1 jul. 2003.

OGAWA, M. M. *et al.* Spectral Manifestation of Melanized Fungal Infections in Kidney Transplant Recipients: Report of Six Cases. *Mycopathologia*, v. 181, n. 5–6, p. 379–385, 1 jun. 2016.

OH, J.-J. *et al.* Fungal melanin as a biocompatible broad-spectrum sunscreen with high antioxidant activity. *Royal Society of Chemistry*, v. 11, 3 abr. 2021.

PAL, A. K.; GAJJAR, D. U.; VASAVADA, A. R. DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species. *Medical Mycology*, v. 52, n. 1, p. 10–18, 2014.

PAOLO, W. F. *et al.* Effects of disrupting the polyketide synthase gene WdPKS1 in *Wangiella* [Exophiala] dermatitidis on melanin production and resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes in temperature. 2006.

PAZYAR, N. *et al.* Comparison of the efficacy of intradermal injected tranexamic acid vs hydroquinone cream in the treatment of melasma. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, v. 12, p. 115–122, 2019.

PEDROSO E SILVA, C. DE M. *et al.* Relato de Caso O Babaçu (*Orbignya Phalerata* Martins) como Provável Fator de Risco de Infecção Humana pelo Agente da Cromoblastomicose No Estado Do Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 28, n. 1, p. 49–52, 1995.

PEREIRA, J. A. L. *et al.* Inhibition of melanization by kojic acid promotes cell wall disruption of the human pathogenic fungus *Fonsecaea* sp. v. 11, n. 925, 17 ago. 2022.

PÉREZ-BLANCO, M, *et al.*, Ajoene and 5-fluoracil in the topical treatment of *Cladophialophora carrionii* chromoblastomycosis in humans: a comparative open study. *Medical Mycology*, v. 41, n. 6, p-517-20, dezembro de 2003.

PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: a reality check. *Nat Rev Drug Discov*, v. 16, n. 9, p. 603–616, set. 2017.

PICETTI, R. *et al.* What concentration of tranexamic acid is needed to inhibit fibrinolysis? A systematic review of pharmacodynamics studies. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, v. 30 (1), n. 30(1), p. 1–10, 1 jan. 2019.

PINTO, L. *et al.* Activation of the human complement system by pigmented and hypopigmented mycelia of the fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycoses*, v. 54, n. 5, set. 2011.

PURIM, K. S. M. *et al.* Chromoblastomycosis: Tissue modifications during itraconazole treatment. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 92, n. 4, p. 478–483, 1 jul. 2017.

QUEIROZ-TELLES, F. A Cromoblastomicose n estado do Paraná: Etiologia, Epidemiologia, Clínica e Terapêutica com Itraconazol. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30, n. 4, p. 345–346, 1997.

QUEIROZ-TELLES, F.; *et al.* Chromoblastomycosis: An overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Medical Mycology*, v. 47, n. 1, p. 3–15, 2009.

QUEIROZ-TELLES, F.; HOOG, S. DE; *et al.* Chromoblastomycosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 30, n. 1, p. 233–276, 1 jan. 2017.

QUEIROZ-TELLES, F.; FAHAL, A. H.; *et al.* Neglected endemic mycoses. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 11, p. e367–e377, 1 nov. 2017.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D. W. C. L. Chromoblastomycosis in the clinical practice. *Current Fungal Infection Reports*, v. 6, n. 4, p. 312–319, 1 dez. 2012.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D. W. DE C. L. Challenges in the Therapy of Chromoblastomycosis. *Mycopathologia*, v. 175, p. 477–488, 2 maio 2013.

RAJARATNAM R *et al.* Interventions for melasma (Review). *The Cochrane Collaboration*, n. 7, 2010.

RANAWAKA, R. R. Treatment of chromoblastomycosis with a combination of debulking surgery, intralesional amphotericin B, and oral terbinafine. *International Journal of Dermatology John Wiley and Sons Inc*, 1 ago. 2021.

REVANKAR, S. G.; SUTTON, D. A. Melanized fungi in human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n. 4, p. 884–928, out. 2010.

REX, J. H. *et al.* M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, v. 28, n. 16, abr. 2008.

ROSARIO, E. DEL *et al.* Randomized, placebo-controlled, double-blind study of oral tranexamic acid in the treatment of moderate-to-severe melasma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 78, n. 2, p. 363–369, 1 fev. 2017.

SAKI, N.; DARAYESH, M.; HEIRAN, A. Comparing the efficacy of topical hydroquinone 2% versus intradermal tranexamic acid microinjections in treating melasma: a split-face controlled trial. *Journal of Dermatological Treatment*, v. 29, n. 4, p. 405–410, 2018.

SANTOS, A. L. S. *et al.* Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 31, n. 5, p. 570–591, set. 2007.

SANTOS, D. W. C. L. *et al.* Chromoblastomycosis in an endemic area of Brazil: A clinical-epidemiological analysis and a worldwide haplotype network. *Journal of Fungi*, v. 6, n. 4, p. 1–14, 1 out. 2020.

SANTOS, D. W. DE C. L.; *et al.* The global burden of chromoblastomycosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 8, 1 ago. 2021.

SANTOS, D. W. DE C. L.; AZEVEDO, C. DE M. P. E S.; QUEIROZ-TELLES, F. Dermatological Fungal Neglected Tropical Diseases. *Current Fungal Infection Reports*, v. 19, n. 6, 8 maio 2025.

SARKAR, R. *et al.* The Combination of Glycolic Acid Peels With a Topical Regimen in the Treatment of Melasma in Dark-Skinned Patients: A Comparative Study. *Dermatol Surg*, v. 28, n. 9, p. 828–832, 2002.

SARKAR, R.; BANSAL, A.; AILAWADI, P. Future therapies in melasma: What lies ahead? *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, v. 86, n. 1, p. 8–17, 1 abr. 2020.

SATHIYAMOORTHY, E. *et al.* Hydroquinone derivatives attenuate biofilm formation and virulence factor production in *Vibrio* spp. *International Journal of Food Microbiology*, v. 384, 2023.

SEARLE, T.; AL-NIAIMI, F.; ALI, F. R. Hydroquinone: myths and reality *Clinical and Experimental Dermatology* John Wiley and Sons Inc, , 1 jun. 2021.

SEHGAL, V. N. *et al.* Melasma: Treatment strategy. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, v. 13, n. 6, p. 265–279, dez. 2011.

SHIN, J. W.; PARK, K. C. Current clinical use of depigmenting agents *Dermatologica Sinica* Elsevier Ltd, 1 dez. 2014.

SIDDIQUI, Z. N. *et al.* Syntheses, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*, v. 17, p. 237–243, 2012.

SILVA DE AZEVEDO, C. DE M. P. Aspectos clínicos e epidemiológicos da Cromoblastomicose no Maranhão com abordagem na Imunidade celular e humoral. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

SILVA HELLWIG, A. H. DA *et al.* In vitro susceptibility of chromoblastomycosis agents to antifungal drugs: A systematic review Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2019.

SILVA SENA, DA *et al.* *Trichoderma asperellum* Extract Isolated from Brazil Nuts (*Bertholletia excelsa* BONPL): In Vivo and in Silico Studies on Melanogenesis in Zebrafish. Microorganisms, v. 11, n. 1089, 21 abr. 2023.

SLIWOSKI, G. *et al.* Computational methods in drug discovery. Pharmacological Reviews, v. 66, n. 1, p. 334–395, jan. 2014.

SMITH, D. J. *et al.* A global Chromoblastomycosis strategy and development of the global chromoblastomycosis working group. PLOS Neglected Tropical Diseases, 15 out. 2024.

SMITH, D. J. *et al.* Establishment of epidemiological cutoff values for *Fonsecaea pedrosoi*, the primary etiologic agent of Chromoblastomycosis, and eight antifungal medications. ASM Journal of Microbiology, 4 abr. 2025.

SOBRAL, F. A. *et al.* Tranexamic Acid Action on Liver Regeneration After Partial Hepatectomy: Experimental Model In Rats. Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva: ABCD - Brazilian archives of digestive surgery, v. 29, n. 2, p. 102–104, 1 abr. 2016.

SPIERINGS, N. M. K. Melasma: A critical analysis of clinical trials investigating treatment modalities published in the past 10 years. Journal of Cosmetic Dermatology, v. 00, p. 1–6, 2019.

SUN, J. *et al.* Molecular Characterization of Pathogenic Members of the Genus *Fonsecaea* Using Multilocus Analysis. PLoS ONE, v. 7, n. 8, p. 41512, 2012.

SURYANARAYANAN, T. S. *et al.* Characterization of the melanin pigment of a cosmopolitan fungal endophyte. Mycological Research, v. 108, n. 8, p. 974–978, 2004.

SUWANNARACH, N. *et al.* Characterization of melanin and optimal conditions for pigment production by an endophytic fungus, *Spissiomycetes endophytica* SDBR-CMU319. PLoS ONE, v. 14, n. 9, 2019.

TAWADE, Y. *et al.* Uncommon Presentation of Chromoblastomycosis. CUTIS p. 442–448, 2018.

TEHRANCHINIA, Z.; SAGHI, B.; RAHIMI, H. Evaluation of Therapeutic Efficacy and Safety of Tranexamic Acid Local Infiltration in Combination with Topical 4% Hydroquinone Cream Compared to Topical 4% Hydroquinone Cream Alone in Patients with Melasma: A Split-Face Study. Dermatology Research and Practice, v. 2018, 2018.

THORNTON, C. R. *et al.* Identifying the emerging human pathogen *Scedosporium prolificans* by using a species-specific monoclonal antibody that binds to the melanin biosynthetic enzyme tetrahydroxynaphthalene reductase. Environmental Microbiology, v. 17, n. 4, p. 1023–1038, 1 abr. 2015.

TORRES, E. *et al.* Carcinoma epidermoide como complicação letal de lesões crônicas de cromoblastomicose. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 85, n. 2, p. 267–270, 2010.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Chromoblastomycosis. *Clinics in Dermatology*, v. 30, n. 4, p. 403–408, jul. 2012.

URÁN, M. E.; CANO, L. E. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *Asociación Colombiana de Infectología*, v. 12, n. 2, p. 357–377, 2008.

VALENTIN, J. Chromoblastomycosis in French Guiana: Epidemiology and Practices, 1955-2023. *Journal of Fungi*, v. 10, n.168, 22 de fevereiro de 2024.

VEASEY, J. V. *et al.* Tratamento cirúrgico e seguimento a longo prazo das micoses subcutâneas causadas por fungos demáceos: Cromoblastomicose, feofomicose e eumicetoma. *Surg Cosmet Dermatol*, v. 9, n. 1, p. 29–33, 2017.

WAH TSE, T.; DERM, C.; HUI, E. Tranexamic acid: an important adjuvant in the treatment of melasma. *Journal of Cosmetic Dermatology*. [s.l: s.n.].

WALI, V.; PARWANI, H. Comparative study of oral tranexamic acid and triple combination versus tranexamic acid through microneedling in patients of melisma. *International Journal of Research in Dermatology*, v. 5, n. 3, p. 537, 24 jul. 2019.

WHO/ NTD. Ending de Neglected to attain the sustainable development goals: A road mapfor neglected tropical diseases 2021-2030. 28 de Janeiro de 2021.

YU, J. *et al.* In vitro interaction of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fugi causing chromoblastomycosis in China. *Informa Healthcare*, v. 46, 2008.

ZEESHAN, M. *et al.* Chromoblastomycosis: A Single Centre Clinical Laboratory Experience of Seven Years (2016-2022) and Literature Review from Pakistan. *Mycoses*, v. 67, p. 13796, 2024.

ZHANG, R. *et al.* A Case of Chromoblastomycosis Caused by *Fonsecaea Pedrosoi* and Investigation of the Pathogenic Fungi. *Mycopathologia Springer Netherlands*, , 1 abr. 2019.

ZHOU, H. *et al.* A rare case of refractory facial phaeohyphomycosis caused by *Cladosporium halotolerans* successfully treated with aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 42, p. 103347, 1 jun. 2023.

ZHOU, L. L.; BAIBERGENOVA, A. Melasma: systematic review of the systemic treatmentsInternational Journal of Dermatology Blackwell Publishing Ltd, 1 set. 2017.

ZHU, C. Y. *et al.* Analysis of the effect of different doses of oral tranexamic acid on melasma: a multicenter prospective study. *European Journal of Dermatology*, v. 29, n. 1, p. 55–58, 1 jan. 2019.

10.APÊNDICE

Artigo publicado durante o desenvolvimento da presente tese, incluído neste apêndice em sua versão integral, conforme publicado na Revista One Healthy Mycology, ISSN 3050-4627 (Online), no ano de 2024, com o título: “CARD-9 mutations and T cell immune response in patients with Chromoblastomycosis”, sob o DOI: [10.63049/OHM.24.11.3](https://doi.org/10.63049/OHM.24.11.3), que segue na íntegra logo abaixo. Além disso, a partir dos dados da tese, o artigo “**Unveiling tranexamic acid–melanin interactions: docking-based insights into melasma therapy**” já foi submetido sob o ID: EXD-25-0441, à revista Experimental Dermatology e aguarda o resultado da revista.

CARD9 mutations and T cell immune response in patients with chromoblastomycosis

Tatiana Sobianski Herman^{1,2}, Conceição de M. Pedroni e S. Azevedo³, Anamélia Lorenzetti Bocca⁴, Bruna Jacomei Favoreto de Souza Lima^{1,5,12}, Caroline Pavini Beato-Souza⁶, Emanuel Razzolini^{7,13}, Sirlei G. Marques¹², Natália Nunes⁵, Bruno Paulo Rodrigues Lustosa^{5,12}, Daniel Wagner Castro Lima Santos^{8,9}, Flávio Queiroz-Telles¹², Sybren de Hoog^{2,4}, Renata R. Gomes^{2,4,12*} and Vania Aparecida Vicente^{1,4,7,12*}

¹Microbiology, Parasitology and Pathology Graduate Program, Department of Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil; ²Graduate Program in Molecular Pathology, University of Brasília, Brasília, Brazil; ³Department of Medicine I, Graduate Program in Health Science, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil; ⁴Applied Immunology Laboratory, Cell Biology Department, Institute of Biological Science, University of Brasília, Brasília, Brazil; ⁵Department of Medical Microbiology, Radboudumc/CWZ Center of Expertise in Mycology, Nijmegen, The Netherlands; ⁶Department of Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil; ⁷Engineering Bioprocess and Biotechnology Graduate Program, Department of Bioprocess Engineering and Biotechnology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil; ⁸Change to d'Or Institute of Research and Education; ⁹Clinical Hospital of Federal University of Maranhão; ¹⁰Department of Public Health, Clinical Hospital, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil; ¹¹Mycobiological Collections of Paraná Network, Curitiba, Brazil; ¹²Clinical Hospital of Federal University of Maranhão Presidente Dutra, São Luís, Brazil

*Correspondence: vaniaa63@gmail.com, rrrenata@gmail.com

Article highlights:

- Presence of mutation in CARD9 is associated with moderate and severe lesions in patients with chromoblastomycosis (CBM).
- Low levels of IL-6 and TNF- α were observed in severe cases.

Keywords: chromoblastomycosis; black yeast; CARD9; *Pentecostia*; phaeohyphomycosis; inherited immune disorder

- Received 8 December 2023
- Revised 25 January 2024
- Accepted 29 January 2024
- Appeared online 10 February 2024
- One Health Mycology 1(1): 14–23, 2024
- doi.org/10.63049/OHM.24.113

Abstract

Background. CARD9 is an adaptive protein in myeloid cells that is important in the immune response to intracellular fungi and bacteria. It is present in the intracellular cascade of antigen-presenting cells that perform the recognition of fungal antigens by C-type lectin receptor recognition molecules. Mutations in this gene have been associated with defects in the polarization of T cells, increasing the susceptibility and severity of the conditions in fungal infections. The immune response in chromoblastomycosis (CBM) is still not completely elucidated.

Objectives. The main objective of this work was to identify mutations in CARD9 associated with changes of immune response in patients with CBM.

Methods. Sequencing of the 12 exons of the CARD9 gene of 23 patients with CBM was carried out. For the survey of clinical data, the criterion for classification of lesions and the severity of the condition was adopted, considering the number, extent, and dissemination of lesions as mild, moderate, or severe. TNF- α , IL-6 and IL-10 were measured prior to treatment.

Results. A correlation was found between severity of the condition presented by the patients and the presence of the mutation ($p < 0.05$). Besides, low levels of IL-6 and TNF- α were observed in severe cases, both related to the Th1 and Th17 profile. However, no significant statistic association could be established between the polarization of the immune response and the presence of the mutation ($p > 0.06$).

Conclusions. The mutation has a significantly increased

should be analyzed for statistical significance. Patients with CBM previously were thought to be immunocompetent, but our data indicate that inherited immune disorders may play a role in the development of the disease.

Introduction

Caspase Family Recruitment Domain 9 (CARD9) is an adaptive protein in myeloid cells that is important in the immune response to intracellular fungi and bacteria (Bj et al., 2018). This protein is present in the intracellular cascade of antigen-presenting cells (APCs) that perform the recognition of fungal antigens by C-type lectin receptor (CLR) recognition molecules. CARD9 activates nuclear factor Kappa B (NF- κ B), which stimulates the polarization of CD4+ cells for a Th1 and Th17 response (Gross et al., 2006; LeibundGut-Landmann et al., 2007; Zhong et al., 2018).

The CARD9 gene encodes the protein; mutations in this gene have been associated with defects in the polarization of T cells, increasing the susceptibility and severity of the conditions in fungal infections (Drummond et al., 2016). Infections by *Candida albicans* (Cetinkaya et al., 2018; Drummond et al., 2015; Glocker et al., 2009; Lanternier et al., 2013) and by other *Candida* species (Drenth et al., 2013; Lanternier et al., 2015) is associated with increased susceptibility to recurrent or invasive infections. There are also reports of cases of dermatophytosis, e.g., *Trichophyton mentagrophytes* (Gru-mach et al., 2015), and of dematiaceous fungal infections such as *Corynespora cassiicola* (Yan et al., 2016), *Exophiala* spp.



(Lanternier et al., 2015) and *Phialophora verrucosa* (Liang et al., 2015). Susceptibility to fungal infections is highly specific, being particularly due to *Candida* species, dermatophytes, and black fungi (Vaezi et al., 2018), while a common opportunist like *Aspergillus* is remarkably uncommon (Zhang et al., 2020).

Regarding black yeasts, mutations in *CARD9* have been observed in patients with phaeohyphomycosis (Yan et al., 2016; Lanternier et al., 2015; Liang et al., 2015; Zhang et al., 2017). Liang et al. (2015) demonstrated that *CARD9*-deficient polymorphonuclear neutrophils (PMNs) is associated with decreased fungicidal capacity and decreased cytokines of Th1 and Th17 profiles in a study with *P. verrucosa*. Although *P. verrucosa* is an occasional agent of CBM (Ahmed et al., 2021), there are no focused reports in the literature on the association between mutations in *CARD9* in patients with CBM. CBM is a cutaneous and subcutaneous disease caused by traumatic inoculation of the agent in the host tissue. Due to the profile of the affected population, the disease is considered occupational, and it has recently been included by World Health Organization (WHO) as a neglected disease (Queiroz-Telles et al., 2017). Etiologic agents of the disease are members of the order *Chaetothyriales*, the main associated species being *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladophialophora carrionii*. After implantation into the tissues, these agents turn into brownish and septate cells called muriform cells. They are assumed to be the main characteristic of the disease, which has a slow evolution (Queiroz-Telles et al., 2017). The immune response has been strongly associated with the condition presented by the patients, mainly the role of T-cell polarization. The Th1-type response has been related to the milder conditions of the disease, while patients with a Th2 response have a worse prognosis (d'Ávila et al., 2003; Gimenes et al., 2005). The role of the Th17 response in this disease was also demonstrated by Wüthrich et al. (2015).

Chromoblastomycosis is considered a chronic disease and studies have related the patient's immune response to the evolution of the disease and the response to treatment (Queiroz-Telles et al., 2017; Purim et al., 2017). The immune response in CBM is still not completely elucidated; therefore, studies on the immune mechanisms associated with the clinical course of the disease are needed. In this scenario, the main objective of this work was to identify mutations in *CARD9* and their association with an immune response in patients with CBM.

Materials and methods

Samples

The experiments were carried out in the University Federal of Paraná (UFPR) Microbiology laboratory. For this study, blood samples ($n = 23$) were collected from patients diagnosed with CBM (Table 2) at the Reference Center for Infectious and Parasitic Diseases (CREDIP) of the Federal University of Maranhão (UFMA). The study was submitted to the ethics committee of UFMA (approval document number: 1.276.342). Patients in this evaluation signed the consent form, and the samples were sent to the Federal University of Paraná (UFPR).

DNA extraction

The whole blood samples with anticoagulant (EDTA) were subjected to genomic DNA extraction using the PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen, Waltham, MA, U.S.A.) according to the manufacturer's instructions. The extraction quality was checked using a NanoDrop® 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) and by electrophoresis in 1% agarose gel (Invitrogen).

Oligonucleotide design

Specific primer oligonucleotides for the *CARD9* gene were constructed from the genetic sequence available in the Ensembl database (ENSG00000187796), with the aid of the SnapGene Viewer program, with the following parameters: (a) size of the primers between 18 and 24 base pairs, (b) ratio between purine bases and pyrimidines between 40 and 60%, (c) annealing temperature of up to 72°C (Lorenz, 2012). After the construction of a possible sets of primers, inter- and intramolecular complementarity was verified using the platform of the websites IDT (Integrated DNA Technologies, www.idtdna.com/calc/analyser) and PCR Primer Stats (www.bioinformatics.org/sms2) and evaluated for specificity through Primer BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). For Exon 06 no specific primer pair was obtained; therefore, an extra reverse primer was designed to obtain specificity in the sequencing. The sequences of the oligonucleotide primers and fragment size and the specific conditions of annealing used are summarized in Table 1.

Amplification and sequencing reaction

PCR was standardized for the amplification of the coding regions of the *CARD9* gene. The reaction was tested in several conditions, using the recombinant Taq DNA Polymerase enzymes (Invitrogen) and Taq Platinum (Invitrogen), observing amplification only with the Taq Platinum enzyme. The amplifications were performed under the following conditions: 4.8 µL of sterile ultrapure water, 1.25 µL of 1× buffer, 1.25 µL (1 µM) of each oligonucleotide initiator, 1.25 µL of dNTP (0.25 mM), 0, 2 µL of Taq DNA Polymerase and 2 µL of the sample (20 ng / µL). The magnesium chloride concentration varied for each primer (Table 1). The PCR of each primer was performed in the Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler programmed with an initial denaturation condition at 94°C for 2 minutes, followed by 35 cycles with a temperature of 94°C for 35 seconds, variable annealing temperature (Table 1) for 30 seconds, 72°C for 1 minute, extension phase at 72°C for 7 minutes and a final delay at 4°C. The PCR products were visualized by electrophoresis on a 1.6% agarose gel and were treated with polyethylene glycol (PEG) for purification. The sequencing reaction was performed using BigDye Terminator Cycle Kit v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) using the following conditions: 8 µL of ultrapure water, 0.75 µL of BigDye, 0.75 µL of 5× sequencing buffer, 0.5 µL of primer and 2 µL per PCR reaction. The reaction occurred under the following conditions: 96°C for 2 minutes, 35 cycles of 96°C for 10 seconds, 52°C for 10 seconds, 62°C for 4 minutes. The sequencing products were purified with ammonium acetate and sequenced on the ABI Prism 3700DNA Sequencer DNA Sequencer (Perkin-Elmer, Norwalk, Foster City, CA, U.S.A.).



Sequence and mutation analysis

The sequences were edited and analyzed using the BioEdit program (Hall, 1997) and MEGA version 7 (Kumar et al., 2016). Then, the sequences obtained were compared with the wild-type CARD9 gene (Ensembl number: ENSG00000187796) and the sequences deposited in the GenBank database (NCBI). With the aid of the MAFFT program (Katoh et al., 2002), alignment and visual inspection were performed with the assistance of the MEGA v7 program. The analysis of the sequences aimed to observe the presence of point mutations. For each exon, samples from twenty-three patients with different clinical conditions were sequenced to track mutations. To assess the potential impact of the polymorphisms found, the PolyPhen2 platform was used (Adzhubei et al., 2010). The platform predicts damage from missense mutations based on data obtained from other databases. The result is reported through a score ranging from 0.0 to 1.0, the result between 0.0 to 0.15 indicates mutations predicted as benign, between 0.16 to 0.85 are possibly harmful and between 0.86 and 1.0 are more confident as harmful. This score is also illustrated by the color system platform, where green represents a result predicted as benign and red as harmful (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

Clinical data and patient immune response

The clinical data was kindly provided by the Immunophysiology Laboratory of the Federal University of Maranhão. For the survey of clinical data, the criterion for classification of lesions (Carrión, 1950) and the severity of the condition was adopted, considering the number, extent, and dissemination of lesions as mild, moderate, or severe (Queiroz-Telles, 1997). Measurement of cytokines was performed prior to treatment. Th1 / Th2 / Th17 responses were quantified for IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , and IL-17, with the Cytometric Bead Array kit (CBA) Mouse Th1 / Th2 / Th17 Cytokine, using plasma sample.

Table 1. Oligonucleotide primers for different regions of the CARD9 gene.

Primer	Sequence	Fragment size	Annealing temperature
Exon 01	F – AGAAAGCAGGTACACAGGGA R – AATGAACACATCTCCGCCCA	368pb	60°C
Exon 02	F – TGGCATCTGGGTGACATGGAT R – CTCTCGAGGAAGGCCACGTA	987pb	55°C
Exon 03	F – CGCAGGGTACCTCATCCAA R – GGTCTGTAGTCTCTCTCTGC	690pb	56°C
Exon 04-05	F – ACACGGCACCATCTGACAC R – AAGGGGGCAAAAGGCAATG	739pb	55°C
Exon 06	F – GCAAGGAGGAGAACTACGAC R – ATCTCTGACAACTGCCCTCA	1273pb 792pb	67.5°C
Exon 07	F – TCTGGAAGTGCAGGGCTGGTA R – ATCTCTGACAACTGCCCTCA	374pb	60°C
Exon 08	F – AAGGGCAGCAGGGACAACCTG R – CCACTCTCAGGTCGGAGCT	800pb	62°C
Exon 09-10	F – AGGGCACACGACGAGTCA R – GTTGACACAGGCATGCGGC	789pb	54°C
Exon 11	F – GAAAGCAGAGTCTACACTGGA R – TGAGGGAACCCCTCTCTCT	766pb	55°C
Exon 12	F – AGAAGGACGGGTCCCTCA R – GCGGAAGCGGCGTCTT	836pb	56°C

Statistical analysis

The univariate statistical analysis of variance (ANOVA) and Tukey's parametric test were used to evaluate the correlation amidst mutations, clinical aspects, and TNF- α and IL-6 levels.

Results

A total of 12 pairs of primer oligonucleotides (primers) were designed for the exons of the CARD9 gene from visual inspection in the SnapGene Viewer program. Fig. 1 represents the CARD9 gene with the primers designed for each gene exon. For the study, a total of twenty-three samples ($n = 23$) from the patients with different clinical conditions were selected, considering the mild, severe, and moderate groups (Table 2), according to Queiroz-Telles (1997). Of the 12 exons present in the CARD9 gene, changes in the sequence were observed only for exon 2. An exchange of the guanine nucleotide for adenine was observed at position 1638 of the gene and 201 of the cDNA (Fig. 2), located in exon 2, in twelve of the twenty-three sequenced patient samples. Out of this, four were homozygous, being three severe and one moderate, and eight were heterozygous, i.e., one severe, six moderate, and one mild. Three of the 11 patients who did not have the mutation were classified as severe, two as moderate, and six as mild.

The mutation found is expressed by a missense change, replacing the amino acid serine by asparagine at position 12 of the protein chain. This mutation is deposited in the NCBI with the reference rs4077515 and is called CARD9 S12N. Such a mutation is known to occur with a frequency of 16.7% in the Caucasian population and 9.7% in the Afro-American population (Rosentul et al., 2014). *In silico*, using the PolyPhen2 software, the mutation is expected to be benign, with a score of 0.002.

Of the 23 patients, seven had the mild form of the disease, nine had the moderate form, and seven had the severe form. TNF- α was detected in one patient with mild form, six with moderate form, and four with severe form (Table 2). IL-6 was detected in twenty-two samples; the highest values (>10.000) were found in patients with moderate (two) and severe (one) forms, and patients with the mild form presented in their majority dosage below 50 ng/mL. Seven patients

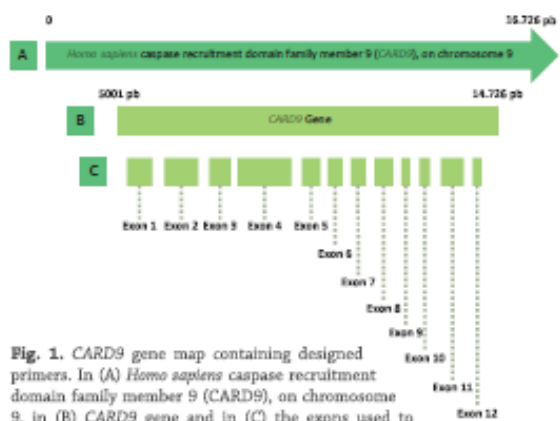


Fig. 1. CARD9 gene map containing designed primers. In (A) *Homo sapiens* caspase recruitment domain family member 9 (CARD9), on chromosome 9, in (B) CARD9 gene and in (C) the exons used to amplify the CARD9 gene regions.



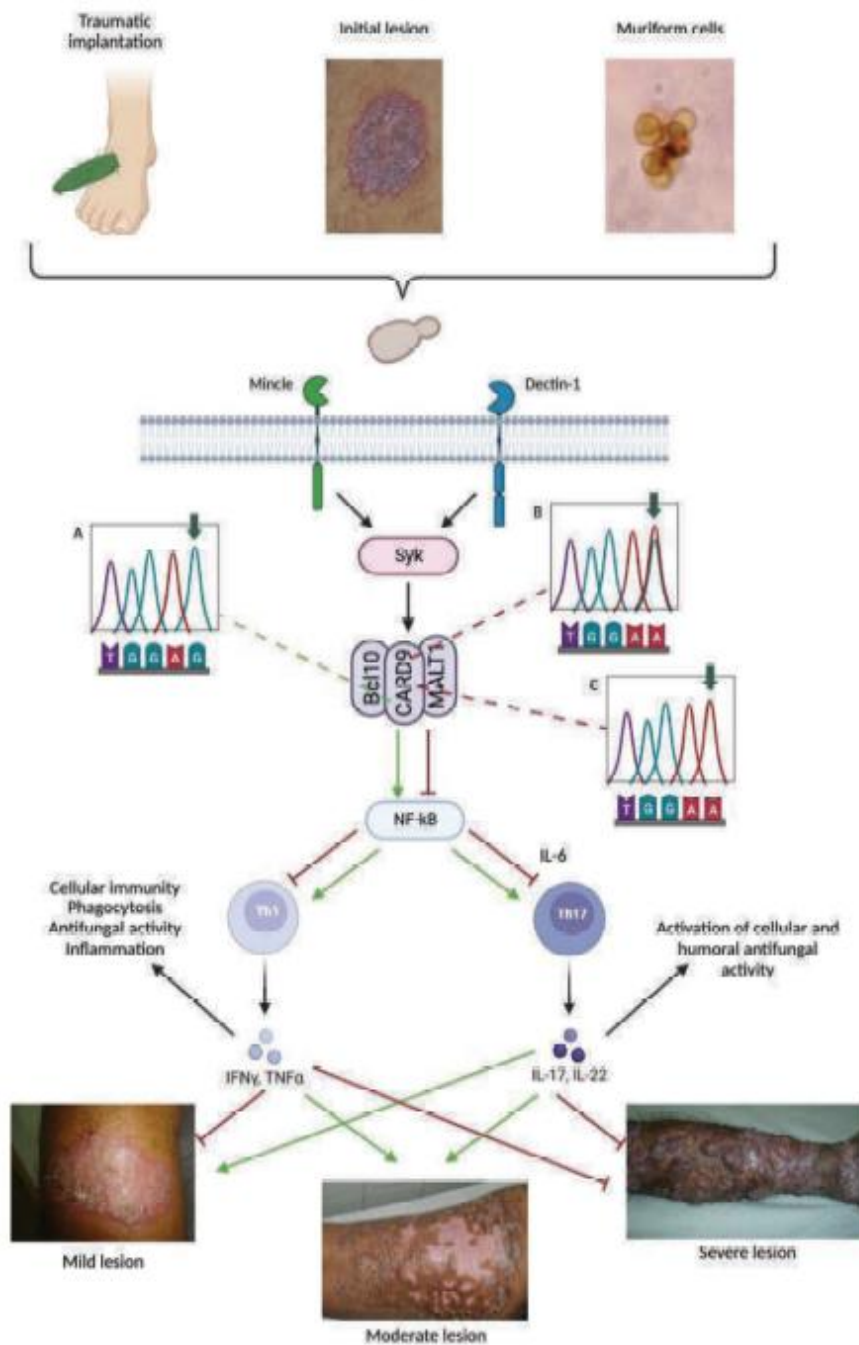


Fig. 2. Immunological aspects of CARD9 mutation on chromoblastomycosis. After traumatic inoculation, fungal antigens triggers Mincle and Dectin-1 signaling to recruit spleen tyrosine kinase (Syk) and induces signaling through CARD9-Bcl10-MALT1 complex. When CARD9 is not mutated (A), this complex activates NF-κB which induces IL-6 production and Th1 and Th17 polarization with release of IFN-γ, TNF-α, IL-17, and IL-22. However, when CARD9 is mutated (B, heterozygous; C, homozygous), this pathway does not occur, resulting in inhibition of Th1 and Th17 profile. According to data shown in Table 2, different levels of IL-6 and TNF-α are observed for each classification (mild, moderate, and severe) suggesting the relevance of Th17 polarization to lesion severity.



had detectable concentrations of IL-10, two with a mild form, with a peak below 1 pg/mL, three patients with a moderate form and peaks of up to 15 pg/mL, and two patients with a severe form, one with a peak below 1 pg/mL and one with a larger peak than 100 pg/mL.

Out of 9 patients with the mild form of the disease, 86% had low cytokine expression (Table 2, Fig. 3). Patients with the moderate and severe forms expressed mainly TNF- α and IL-6, out of which 44% of patients with moderate form showed high concentration of TNF- α , while 57% of those with the severe form had higher proportions of IL-6. Regarding patients with the mutation at position 1,638 of the gene, in exon 02, no relation was found between cytokine concentration and presence of mutations. However, a significant difference ($p < 0.05$) was observed between patients with severe and moderate disease compared with those having the mild form. Among the studied population 53% showed this specific mutation.

Discussion

The mechanisms involved in the innate and adaptive host immune response in chromoblastomycosis are still unclear, but it has been suggested that the adaptive immune response may reflect the condition presented by the patient with CBM (Avelar-Pires et al., 2013). The Th1 response has been identified as the one that corresponds to the best prognosis, in patients as well as in mice models in which there is a spontaneous cure for CBM after a change from Th17 to Th1, emphasizing that polarization of T cell has association with patient's severity condition (Gimenes et al., 2005; Nóbrega et al., 2010; Teixeira de Sousa et al., 2006; Wang et al., 2013).

In the literature, the high levels of TNF- α have been associated with a more efficient immune response in CBM and were observed in a more significant lesion regression period during treatment (LeibundGut-Landmann et al., 2007; Gimenes et al., 2006). High levels of TNF- α are also observed in mice infected with *Fonsecaea pedrosoi* (Wang et al., 2013). In the present study, the highest levels of this cytokine were found in patients with moderate and severe forms, with low or undetected levels of TNF- α being observed in the mild form, however statistical analysis showed no significance, which might be related to the restrict number of patients analyzed. This result was compatible with that demonstrated by Gimenes et al. (2005) who observed no significant differences in TNF- α levels in patients with severe and mild forms of the disease.

In the present study, increased levels of IFN- γ were not observed. However, Gimenes et al. (2005) found higher levels of this cytokine in patients with the mild form of the disease, combined with Th1 polarization. D'Ávila et al. (2003) observed similar polarization in patients with erythematous atrophic plaque, but only few cells expressed IFN- γ . Polarization towards Th2, characterized by higher levels of IL-10, has been more observed in severe cases (D'Ávila et al., 2003; Gimenes et al., 2005; Sousa et al., 2011). In the patients of the present study, few peaks of IL-10 were identified, most of them being associated with moderate and severe cases. The lowest concentrations of cytokines were found in patients

with mild conditions, while patients with moderate or severe forms had very high peaks of more than one cytokine (Table 2, Fig. 3).

According to Xu et al. (2018), exacerbated immune responses may be related to the persistence of fungi in the host tissue, and inoculation of muriform cells led to greater expression of IL-6 and TNF- α . These authors also demonstrated the role of Th17 and Th1 suppression in mice infected with muriform cells. Similar data were found in the patients evaluated in this study, wherein 62.5% of the patients with moderate and severe forms showed a higher expression of both IL-6 and TNF- α when compared to patients with mild form. The most significant peaks of IL-6 and TNF- α occurred in patients with moderate and severe disease forms. IL-6 was detected in previous work done by Xu et al. (2018) as well as

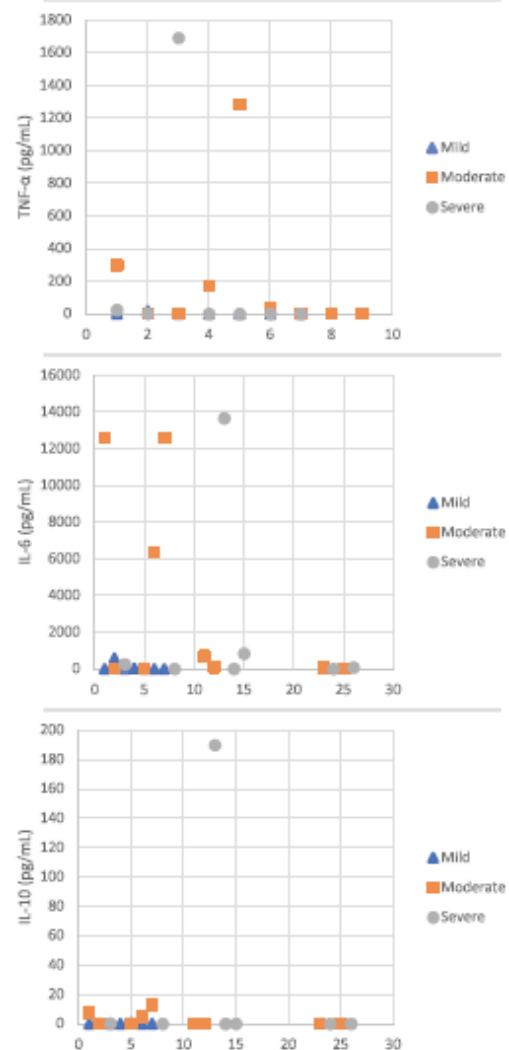


Fig. 3. Levels of cytokines detected in patients with chromoblastomycosis in all 23 patients according to the severity of the disease.



Table 2 – Immunological data of patients.

Patient ID	Age	Gender	Time of illness (years)	Lesion	Classification	Mutation	Type of Mutation	TNF- α	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	Evolution
4	62	Female	3	Infiltrative	Mild	No	GG	0	0	0	0	1.73	0	Clearification
10	72	Male	2	Vegetative	Mild	No	GG	18.09	0	0.13	0.7	573.14	0.07	Chronicity
16	56	Male	8	Infiltrative plaque	Mild	No	GG	0	0	0	0	3.04	0	Clearification
18	44	Male	4	Uninfamed	Mild	Yes	GA	0	0	0	0	32.48	0	Chronicity
20	52	Male	2	Infiltrative plaque	Mild	No	GG	0	0	0	0	5.61	0.58	Uninfamed
22	68	Male	10	Vegetative	Mild	No	GG	0	0	0	0	5.33	0	Cure
28	45	Male	6	Vegetative	Mild	No	GG	0	0	0	0	5.33	0	Chronicity
1	75	Male	5	Vegetative	Moderate	Yes	GA	299.15	0	0	0	12605.71	7.55	Clearification
2	72	Male	5	Vegetative	Moderate	Yes	GA	0	0	0	0	0	0	Chronicity
5	67	Male	10	Infiltrative	Moderate	Yes	GA	0	0	0	0	0.98	0	Clearification
6	49	Male	10	Polymorphic	Moderate	Yes	GA	174.42	0	11.76	5.71	6360	4.45	Uninfamed
7	40	Male	14	Vegetative	Moderate	Yes	GA	1287.27	0	0	0	12605.71	13.11	Chronicity
11	54	Male	5	Infiltrative	Moderate	Yes	AA	33.17	0	0	0	711.76	0	Cure
12	57	Male	7	Vegetative	Moderate	No	GG	0.05	0	0	0	99.58	0	Cure
23	59	Male	25	Vegetative plaque	Moderate	No	GG	5.7	0	0	0	83.72	0	Cure
25	53	Male	10	Infiltrative plaque and scarring	Moderate	Yes	GA	0	0	0	0	3.47	0	Chronicity
3	64	Male	30	Polymorphic	Severe	No	GG	23.54	0	0	0	284.67	0.26	Clearification
8	48	Male	5	Polymorphic	Severe	Yes	AA	0	0	0	0	2.45	0	Chronicity
13	57	Male	8	Polymorphic	Severe	No	GG	1692.78	0.46	0	0	13652.52	189.88	Cure
14	65	Male	6	Polymorphic	Severe	Yes	AA	0.69	0	0	0	4.9	0	Chronicity
15	70	Male	20	Polymorphic	Severe	No	GG	1.12	0	0	0	823	0	Uninfamed
24	35	Male	10	Polymorphic	Severe	Yes	AA	0	0	0	0	0.79	0	Chronicity
26	52	Male	4	Polymorphic	Severe	Yes	GA	0	0	0	0	67.31	0	Chronicity

Abbreviations: GG = absent mutation; AA = Homozygous; GA = Heterozygous

in the serum of the patients in the present study. Also, according to Song et al. (2021), TNF- α impairment is associated with infections in CARD9 mutated patients although in CBM patients IFN- γ levels were the most impaired. TNF- α was identified in most patients, especially in those with moderate and severe conditions. IL-17 expression was not observed in any patient. Published data described a predominance of IL-23, IL-17, and TGF- β markers in the tissue of patients with CBM (Avelar-Pires et al., 2013). Despite this, the expressed levels were lower than in tissue from patients with paracoccidioidomycosis and even in healthy patients. However, Silva et al. (2014) demonstrated that only IL-17 indices were increased in samples from patients with CBM.

Wüthrich et al. (2015) demonstrated that the presence of Th1 and Th17 cells is dependent on the Dectin-2 receptor after *in vitro* and *in vivo* stimulation with *F. pedrosoi* and is associated with CARD9 pathway stimulation. In stimulation of human dendritic cells with *F. monophora*, the expression of IL-6, IL-1 β , IL-23, and IL-12p40 is mediated by the recognition of fungal antigens by Dectin-1 and Mincle receptors (Wüthrich et al., 2015). However, the Mincle receptor suppresses the induction of IL-12p35 expression by Dectin-1 through nucleosome remodeling, generating polarization for Th2 (Wevers et al., 2014). Drummond et al. (2016) pointed out the association between mutations in CARD9 and deficiencies in the immune response to fungi. Regarding recognition patterns, researchers demonstrated that *F. pedrosoi* is firstly recognized by CLRs and that costimulation of Toll-like receptors (TLR), with subsequent induction of proinflammatory cytokines, is related with signaling through Syk/CARD9 pathway, contributing to improved immune response and fungal clearance in mice (da Glória Sousa et al., 2011). However, a relationship between mutations in CARD9 and more severe cases of CBM has not been considered in the literature, studies suggest that CARD9 is almost exclusively associated with infections caused by *Candida*, dermatophytes, and black yeast (Ahmed et al., 2021; Song et al., 2020).

Liang et al. (2015) demonstrated *in vitro* that cells with mutations in CARD9 had their fungicidal activity decreased when exposed to *Phialophora verrucosa* conidia isolated from patients with phaeohyphomycosis. In patients, it has been observed that mutations in CARD9 are associated with the development of phaeohyphomycosis caused by *P. verrucosa* (Song et al., 2021) and by *Exophiala* spp. (Lanternier et al., 2015). Some cases have been described where these black yeast-like fungi caused CBM rather than phaeohyphomycosis (Ahmed et al., 2021).

According to the results obtained in this study, a mutation was found in exon 02 of the CARD9 gene. This mutation had already been described in the literature, with the indication CARD9 S12N (Zhernakova et al., 2008). Its frequency is 16.7% in the Caucasian population and 9.7% in the African American population. Although it is predicted as benign by the PolyPhen2 software, the higher frequency observed among CBM patients studied indicates a correlation. However, authors point out that serine and asparagine, the two amino acids involved in this substitution, have different properties, such as size, hydrophobicity, and phosphorylation potential, and this would influence the function of the CARD9 protein (Rosentul et al., 2011; Xu et al., 2018). Considering

that the patients analyzed in this study didn't present any underlying conditions it is possible to explore the correlation between the presence of this mutation and severity through whole genome or exome sequence approach. Rosentul et al. (2011) have reported this mutation in cases of infection by *Candida* spp. The authors did not find association between the presence of the mutation with infected patients, with specific clinical characteristics, or *in vitro* or *in vivo* measurements of cytokine concentrations. This result was similar to a study on vulvovaginal candidiasis, pointing out that the CARD9 S12N mutation had a similar prevalence in patients and in the control group (Rosentul et al., 2014). However, in a survey of *Aspergillus fumigatus* infection in cells and knockout mice with CARD9 S12N, it was observed that the CARD9 mutation induces a Th2 response in bronchoalveolar macrophages (Xu et al., 2018). In mice with the mutation, an increase in IL-4, IL-5, and IgE, a decrease in Th1 cytokines (IL-12p40 and IFN- γ), and similar levels of Th17 cytokines were observed. In the present study, IL-4 levels were not detected in the patients, and IL-5 and IgE were not measured.

According to the results obtained in this study, it is suggested that there is no significant association between the severity of the lesions and the presence of mutations in the analyzed patients. This suggests that other endogenous and exogenous factors (patient's age, occupation, history of cutaneous trauma, time from onset of symptoms to diagnosis, symptoms, among others) may be related to the type of the lesion of CBM disease (Santos et al., 2021). However, there was a significant difference ($p < 0.05$) between patients with severe and moderate disease compared with mild disease, indicating that individuals with the mutation are more prone to develop aggressive forms of the disease. The CARD9 gene also contributes to other non-fungal innate immune responses, such as responses to intracellular bacterial infections, viral RNA detection, and several inflammatory and autoimmune diseases (Holliday et al., 2018).

Conclusion

The mutation found in this study corresponds to the exchange of the guanine nucleotide for adenine at position 1,638 of the gene and 201 of the cDNA. This translates into the exchange of the amino acid serine for asparagine at position 12 of the protein chain. As reported earlier, the CARD9 S12N mutation has a significantly increased prevalence in the studied population compared to the healthy population. This mutation is suggested to be benign by software that predicts the impact of amino acid changes to the host. However, our study shows that the occurrence of the CARD9 mutation is associated with clinical aspects of patients with CBM. According to the data analyzed here, there was an association between severity of the condition presented by the patients and the presence of the mutation, but there was no association with polarization of the immune response or type of injury. From these data, the mutation cannot be exclusively related with deficiency of cellular response in patients with CBM, but other factors are likely to be involved. Although patients included in this study were not related, the restricted number of patients does not allow inferences about impact of race or ethnicity; this would



require a larger exploration of affected population to be considered. The high presence of the mutation in the studied population, larger than among asymptomatic individuals, indicates an association with CBM, but its exact role remains enigmatic.

Acknowledgments

This research was supported by the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education: National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brasília, Brazil (<http://cnpq.br/>) Grant number 409422/2021-5. Bruna Jacomel Favoreto de Souza Lima and Vania Aparecida Vicente received fellowships from CNPq (project numbers 200221/2023-0 and 312811/2018 respectively). We also thank to the Foundation for Research and Scientific and Technological Development of Maranhão (FAPEMA).

Ethical statement

The work is in accordance with the Research Ethics Committee – CEP-HUUFMA, in accordance with the attributions defined in CNS Resolution no.466/2012 and Operational Standard no. 001 of 2013 of the CNS under CAAE 34385914.4.0000.5086.

Conflict of interest

There was no conflict of interest.

Author contributions

Tatiana Sobianski Herman, Sirlei G. Marques were responsible for the experimental tests. Renata R. Gomes, Conceição de M. Pedrozo and S. Azevedo, Anamelia Lorenzetti Bocca, Vania Aparecida Vicente and Sybren de Hoog are project coordinators responsible for preparing and supervising the execution of the methodological stages of the study. Emanuel Razzolini responsible for sequencing and data analysis. Natália Nunes and Daniel Wagner Castro Lima Santos responsible for designing epidemiological data. Bruna Jacomel Favoreto de Souza Lima and Caroline Pavini Beato-Souza were responsible for the experimental assays and obtaining DNA sequencing data. Flávio Queiroz Telles was responsible for providing epidemiological and serological data for the study.

References

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*. 7(4): 248–249. doi.org/10.1038/nmeth0410-248.
- Ahmed SA, Bonifaz A, González GM, et al. (2021). Chromoblastomycosis caused by *Phialophora* – proven cases from Mexico. *J Fungi*. 7(2): 95. doi.org/10.3390/jof7020095.
- Avelar-Pires C, Simoes-Quaresma JA, Moraes-de Macedo GM, et al. (2013). Revisiting the clinical and histopathological aspects of patients with chromoblastomycosis from the Brazilian Amazon region. *Arch Med Res*. 44(4): 302–306. doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.04.008.
- Bi L, Gojestani S, Wu W, et al. (2018). CARD9 mediates dectin-2-induced I κ B kinase ubiquitination leading to activation of NF- κ B in response to stimulation by the hyphal form of *Candida albicans*. *J Biol Chem*. 285(34): 25969–25977. doi.org/10.1074/jbc.M110.131300.
- Carrión AL. (1950). Chromoblastomycosis. *Annals N Y Acad Sci*. 50(10): 1255–1282.
- Cetinkaya PG, Ayvaz DC, Karaatmaca B, et al. (2018). A young girl with severe cerebral fungal infection due to card 9 deficiency. *Clin Immunol*. 191: 21–26. doi.org/10.1016/j.clim.2018.01.002.
- da Glória Sousa M, Reid DM, Schweighoffer E, et al. (2011). Restoration of pattern recognition receptor costimulation to treat chromoblastomycosis, a chronic fungal infection of the skin. *Cell Host Microbe*. 9(5): 436–443. doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.005.
- d’Ávila SCGP, Pagliari C, Seixas Duarte ML. (2003). The cell-mediated immune reaction in the cutaneous lesion of chromoblastomycosis and their correlation with different clinical forms of the disease. *Mycopathologia*. 156(2): 51–60. doi.org/10.1023/A:1022948329193.
- Drewniak A, Gazendam RP, Tool AT, et al. (2013). Invasive fungal infection and impaired neutrophil killing in human CARD9 deficiency. *Blood*. 121(13): 2385–2392. doi.org/10.1182/blood-2012-08-450551.
- Drummond RA, Collar AL, Swamydas M, et al. (2016). CARD9-dependent neutrophil recruitment protects against fungal invasion of the central nervous system. *PLoS Pathog*. 11(12): e1005293. doi.org/10.1371/journal.ppat.1005293.
- Drummond RA, Lionakis MS. (2016). Mechanistic insights into the role of C-type lectin receptor/CARD9 signaling in human antifungal immunity. *Front Cell Infect Microbiol*. 6: 39. doi.org/10.3389/fcimb.2016.00039.
- Gimenes VME, Criado PR, Martins JEC, Almeida SR. (2006). Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. *Mycopathologia*. 162(2): 97–101. doi.org/10.1007/s11046-006-0041-x.
- Gimenes VME, de Souza MDG, Ferreira KS, et al. (2005). Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes Infect*. 7(4): 708–713. doi.org/10.1016/j.micinf.2005.01.006.
- Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M, et al. (2009). A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *New Engl J Med*. 361(18): 1727–1735. doi.org/10.1056/NEJMoa0810719.
- Gross O, Gewies A, Finger K, et al. (2006). CARD9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature*. 442(7103): 651–656. doi.org/10.1038/nature04926.
- Grumach AS, de Queiroz-Telles F, Migaud M, et al. (2015). A homozygous CARD9 mutation in a Brazilian patient with deep dermatophytosis. *J Clin Immunol*. 35(5): 486–490.
- Hall TA. (1997). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 41(41): 95–98.



- Holliday MJ, Ferrao R, de Leon Boenig G, et al. (2018). Picomolar zinc binding modulates formation of Bcl10-nucleating assemblies of the caspase recruitment domain (CARD) of CARD9. *J Biol Chem.* 293(43): 16803–16817. doi.org/10.1074/jbc.RA118.004821.
- Katoh K, Misawa K, Kuma KI, Miyata T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30(14): 3059–3066. doi.org/10.1093/nar/gkf436.
- Kumar S, Stecher G, Tamara K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molec Biol Evol.* 33(7): 1870–1874. doi.org/10.1093/molbev/msw054.
- Lanternier E, Barbati E, Meinzer U, et al. (2015). Inherited CARD9 deficiency in 2 unrelated patients with invasive *Exophiala* infection. *J Infect Dis.* 211(8): 1241–1250. doi.org/10.1093/infdis/jiv412.
- Lanternier E, Mahdavian SA, Barbati E, et al. (2015). Inherited CARD9 deficiency in otherwise healthy children and adults with *Candida* species-induced meningoencephalitis, colitis, or both. *J Allergy Clin Immunol.* 135(6): 1558–1568. doi.org/10.1016/j.jaci.2014.12.1930.
- Lanternier E, Pathan S, Vincent QB, et al. (2013). Deep dermatophytosis and inherited CARD9 deficiency. *New Engl J Med.* 369(18): 1704–1714. doi.org/10.1056/NEJMoa1208487.
- LeibundGut-Landmann S, Groß O, Robinson MJ, et al. (2007). Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nature Immunol.* 8(6): 630–638. doi.org/10.1038/nri1460.
- Liang F, Wang X, Wang R, et al. (2015). CARD9 deficiencies linked to impaired neutrophil functions against *Phialophora verrucosa*. *Mycopathologia.* 179(5): 347–357. doi.org/10.1007/s11046-015-9877-2.
- Lorenz TC. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Visualized Exper.* 63: e3998. doi.org/10.3791/3998.
- Nóbrega YKM, Lozano VF, de Araújo TS, et al. (2010). The cell wall fraction from *Fonsecaea pedrosoi* stimulates production of different profiles of cytokines and nitric oxide by murine peritoneal cells in vitro. *Mycopathologia.* 170(2): 89–98. doi.org/10.1007/s11046-010-9303-8.
- Purim KSM, Peretti MC, Fillus J, Olandoski M. (2017). Chromoblastomycosis: tissue modifications during itraconazole treatment. *Anais Bras Dermatol.* 92: 478–483. doi.org/10.1590/abd1806-4841.20175466.
- Queiroz-Telles F, de Hoog S, Santos DWC, et al. (2017). Chromoblastomycosis. *Clin Microbiol Rev.* 30(1): 233–276. doi.org/10.1128/CMR.00032-16.
- Queiroz-Telles F, Nucci M, Colombo AL, et al. (2011). Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol.* 49(3): 225–236. doi.org/10.1016/j.myc.2010.03.008.
- Queiroz-Telles F. (2015). Chromoblastomycosis: a neglected tropical disease. *Revta Inst Med Trop S Paulo.* 57: 46–50. doi.org/10.1590/S0036-46652015000700009.
- Queiroz-Telles F. (1997). A cromoblastomicose no estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. *Revta Soc Bras Med Trop.* 30: 345–346. doi.org/10.1590/S0037-86821997000400013.
- Rosenthal DC, Delsing CE, Jaeger M, et al. (2014). Gene polymorphisms in pattern recognition receptors and susceptibility to idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis. *Front Microbiol.* 5: 483. doi.org/10.3389/fmicb.2014.00483.
- Rosenthal DC, Plantinga TS, Oosting M, et al. (2011). Genetic variation in the dectin-1/CARD9 recognition pathway and susceptibility to candidemia. *J Infect Dis.* 204(7): 1138–1145. doi.org/10.1093/infdis/jir458.
- Santos DWC, de Azevedo CDMPEs, Vicente VA, et al. (2021). The global burden of chromoblastomycosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 15(8): e0009611. doi.org/10.1371/journal.pntd.0009611.
- Silva AADL, Criado PR, Nunes RS, et al. (2014). *In situ* immune response in human chromoblastomycosis – a possible role for regulatory and Th17 T cells. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(9): e3162. doi.org/10.1371/journal.pntd.0003162.
- Siqueira IM, de Castro RJA, Leonhardt LCDM, et al. (2017). Modulation of the immune response by *Fonsecaea pedrosoi* morphotypes in the course of experimental chromoblastomycosis and their role on inflammatory response chronicity. *PLoS Negl Trop Dis.* 11(3): e0005461. doi.org/10.1371/journal.pntd.0005461.
- Song Y, Du M, Menezes da Silva N, et al. (2020). Comparative analysis of clinical and environmental strains of *Exophiala spinifera* by long-reads sequencing and RNAseq reveal adaptive strategies. *Front Microbiol.* 11: 1880. doi.org/10.3389/fmicb.2020.01880.
- Song Y, Menezes da Silva N, Vicente VA, et al. (2021). Comparative genomics of opportunistic *Phialophora* species involved in divergent disease types. *Mycoses.* 64: 555–568. doi.org/10.1111/myc.13244.
- Teixeira de Sousa MDG, Ghosn EEB, Almeida SR. (2006). Absence of CD4+ T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. *Scand J Immunol.* 64(6): 595–600. doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01846.x.
- Vaezi A, Fakhr H, Arastehfar A, et al. (2018). *In vitro* antifungal activity of amphotericin B and 11 comparators against *Aspergillus terreus* species complex. *Mycoses.* 61(2): 134–142. doi.org/10.1111/myc.12716.
- Wang H, Mu W, Ja Q, et al. (2013). Cytokine profile of a self-healing *Fonsecaea pedrosoi* infection in murine model. *Cell Biochem Biophys.* 67(2): 599–605. doi.org/10.1007/s12013-013-9547-2.
- Wevers BA, Kaptein TM, Zijlstra-Williams EM, et al. (2014). Fungal engagement of the C-type lectin muncle suppresses dectin-1-induced antifungal immunity. *Cell Host Microbe.* 15(4): 494–505. doi.org/10.1016/j.chom.2014.03.008.
- Wüthrich M, Wang H, Li M, et al. (2015). *Fonsecaea pedrosoi*-induced Th17-cell differentiation in mice is fostered by Dectin-2 and suppressed by Muncle recognition. *Eur J Immunol.* 45(9): 2542–2552. doi.org/10.1002/eji.201545559.
- Xu X, Xu JF, Zheng G, et al. (2018). CARD9 S12N facilitates the production of IL-5 by alveolar macrophages for the induction of type 2 immune responses. *Nature Immunol.* 19(6): 547–560. doi.org/10.1038/s41590-018-0112-4.
- Yan XX, Yu CP, Fu XA, et al. (2016). CARD 9 mutation linked to *Corynespora cassiicola* infection in a Chinese patient. *British J Dermatol.* 174(1): 176–179. doi.org/10.1111/bjd.14082.
- Zhang R, Wang X, Wan Z, Li R. (2017). CARD9 mutations and related immunological research of one case with disseminated phaeoerythromycosis. *J Microbiol Infect.* 12: 14–23.
- Zhang Y, Huang C, Song Y, et al. (2021). Primary cutaneous aspergillosis in a patient with CARD9 deficiency and *Aspergillus* susceptibility of Card9 knockout mice. *J Clin Immunol.* 41(2): 427–440. doi.org/10.1007/s10875-020-00909-0.
- Zhernakova A, Festen EM, Franke L, et al. (2008). Genetic analysis of innate immunity in Crohn's disease and ulcerative colitis identifies two susceptibility loci harboring CARD9 and IL18RAP. *Amer J Human Genet.* 82(5): 1202–1210. doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.03.016.
- Zhong X, Chen B, Yang L, Yang Z. (2018). Molecular and physiological roles of the adaptor protein CARD9 in immunity. *Cell Death Dis.* 9(2): 1–11. doi.org/10.1038/s41419-017-0084-6.



Ainda durante o andamento do doutorado foi publicado o suplemento oficial do ISHAM (International Society for Human and Animal Mycology) na revista Medical Mycology, ISSN 1460-2709, do poster apresentado em 2022, com o título “Paracoccidioidomycosis severe: Bizarre presentation in the face”, acessado pelo link: <https://doi.org/10.1093/mmy/myac072.P160>.

P160

Paracoccidioidomycosis severe: Bizarre presentation in the face

Conceicao De Maria Azevedo¹, Rodrigo Holanda², Sirlei Marques¹, Raimunda Ribeiro Silva¹, Natália Nunes¹, Bernardo Wittlin¹, Daniel Wagner Santos¹

¹Federal University of Maranhão, Sao Luis, Brazil

²Universidade CEUMA, SÃO LUÍS, Brazil

Poster session 2, September 22, 2022, 12:30 PM - 1:30 PM

Introduction: Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. The disease is restricted to Latin America. It is the principal systemic mycosis in Brazil, with higher incidences in the southern, southeastern and central regions.

Objectives: It's to report a case of paracoccidioidomycosis with a bizarre presentation on the face.

Case Report: A 54-year-old male farmer from Açailândia, Maranhão, with a history of an extensive ulcerated lesion that started in the right wing of the nose. After 6 months of evolution, the lesion had already spread reaching the nasal and oral mucosa, evolving with acute respiratory failure, requiring tracheostomy (Fig.1). He was referred to the Cancer Hospital for a biopsy, which was referred for pathological examination, showing an intense inflammatory infiltrate consisting of lymphocytes, histiocytes, neutrophils with giant, multinucleated cells that phagocytize refringent bodies, compatible with paracoccidioidomycosis. Material sent for direct examination and culture, showed positive for *Paracoccidioides* sp. After PCR amplification of the genetic material and sequencing, *P. brasiliensis* was identified. Chest tomography showed sparse ground-glass attenuation, but affecting both lungs and radiodense striations in the lower lobes bilaterally. Treatment was established with liposomal amphotericin B, with a good therapeutic response (Fig. 2). The patient was discharged from the hospital using itraconazole and still upper outpatient follow-up, with good healing of the lesions.

Conclusion: Paracoccidioidomycosis can get a severe presentation, distancing the physician from the diagnosis, showing that in all these situations, simple tests, such as the direct examination of lesional material or sputum can elucidate the diagnosis. We need to think about it in endemic area.



Por fim, a apresentação de pôster eletrônico ocorreu no ano de 2021, no 11º Congresso Brasileiro de Epidemiologia, no Eixo Temático de Vigilância Epidemiológica e Vigilância em Saúde, com o Título: Fazer atividade física suficiente é sinônimo de ser saudável? Dados VIGITEL 2015-2019.

io de Slides do PowerPoint - epi 11 apresentação - PowerPoint



Fazer atividade física suficiente é sinônimo de ser saudável? Dados VIGITEL 2015 – 2019

Nunes, Marina

Nunes, Natália

Apresentadora: Natália Nunes



EPI 2021
ISSN: 2594-6293

Login (/user/login/ashna

FAZER ATIVIDADE FÍSICA SUFICIENTE É SINÔNIMO DE SER SAUDÁVEL? DADOS VIGITEL 2015 – 2019

Marina Nunes (Marina Nunes) (/epi-2021/autores/marina-nunes?lang=pt-br) Natália Nunes (Natália Nunes) (/epi-2021/autores/natalia-nunes?lang=pt-br)
Vol 2, 2021 - 142568

Pôster Eletrônico - PE51 - Vigilância epidemiológica e vigilância em saúde (TODOS OS DIAS)

☆ (/user/login/ashnazg?destination=/proceedings/100234/_papers/142568/favorite%3Flang%3Dpt-br&lang=pt-br)

COMO CITAR ESSE TRABALHO?

Resumo

Objetivo: Avaliar se as pessoas que fazem atividade física suficiente podem ser consideradas saudáveis. **Métodos:** Os dados obtidos são do inquérito populacional Vigitel. As frequências e proporções foram avaliadas pelo Teste Qui-Quadrado de Rao-Scott considerando amostra complexa estratificada por região brasileira no programa SPSS. Foram considerados saudáveis os indivíduos que não consumiram refrigerante regularmente (< 5 vezes por semana), ingeriram frutas, verduras e legumes conforme a recomendação (> 5 vezes por semana) e não apresentavam excesso de peso (sobrepeso ou obesidade). **Resultados:** Constatou-se maior percentual de mulheres consideradas ativas e elevados números de distróficos segundo IMC, ou seja, cerca de 60%. Observou-se que apenas 10%, aproximadamente, dos indivíduos são considerados saudáveis. **Conclusões:** O presente estudo mostrou que, nos indivíduos com atividade física suficiente, somente um percentual muito modesto foi considerado saudável.

Eixo Temático

- Vigilância epidemiológica e vigilância em saúde