

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Josias da Rosa Stefanello

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Conidiobolus lamprauges*  
FRENTE A FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS**

Santa Maria, RS.  
2018

**Josias da Rosa Stefanello**

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Conidiobolus lamprauges*  
FRENTE A FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Janio Morais Santurio

Santa Maria, RS  
2018

Stefanello, Josias da Rosa  
Suscetibilidade in vitro de Conidiobolus lamprauges  
frente a fármacos antimicrobianos / Josias da Rosa  
Stefanello.- 2018.  
52 f.; 30 cm

Orientador: Janio Morais Santurio  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, RS, 2018

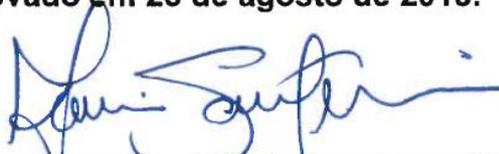
1. Conidiobolus spp. 2. Suscetibilidade 3.  
Antifúngicos 4. Antibacterianos 5. Miltefosina I.  
Santurio, Janio Morais II. Título.

Josias da Rosa Stefanello

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Conidiobolus lamprauges*  
FRENTE A FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

**Aprovado em 23 de agosto de 2018:**



---

Janio Moraes Santurio, Dr. (UFSM)



---

Érico Silva de Loreto, Dr. (SOBRESP)



---

Sônia de Avila Botton, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS  
2018

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

À UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, por todo o apoio estrutural, profissional e financeiro durante todos os anos de estudo nesta instituição.

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe Cleusa Maria Mario da Rosa e ao meu irmão Jader da Rosa Stefanello, por todo o apoio e a paciência que tiveram comigo nos momentos de dificuldades.

Ao professor Janio Morais Santurio, orientador durante o mestrado. Agradeço pelos ensinamentos, confiança e oportunidade de ingressar no Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI).

Ao professor Sydney Hartz Alves, pelo apoio, ensinamentos e disponibilidade em me ajudar sempre que solicitei.

A todos do LAPEMI pela paciência e disposição em ajudar.

Um agradecimento em especial para Fernanda Baldissera Piasentin e Juliana Simone Moraes Tondolo, pela grande ajuda no experimento e escrita do artigo.

Aos meus amigos, Matias, Mateus, Ricardo, Rene, Edu, Diego, Maiara e aos meus colegas de trabalho do Hospital Universitário de Santa Maria em especial a Claudia Bertoncheli dos Santos, agradeço pela amizade, ajuda, apoio, incentivo e paciência que tiveram comigo.

À banca de defesa agradeço a disponibilidade em avaliar e contribuir com meu trabalho.

Agradeço também àqueles que não mencionei, mas que de alguma forma se fizeram presentes me ajudando e incentivando nesse tempo do mestrado.

Obrigado!

## RESUMO

### SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Conidiobolus lamprauges* FRENTE A FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS

AUTOR: Josias da Rosa Stefanello  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Janio Morais Santurio

A conidiobolomicose é uma infecção importante, de difícil tratamento. A doença é causada pelos fungos *Conidiobolus coronatus*, *C. incongruus* e *C. lamprauges*, afetando ovinos, equinos, caninos e humanos. Não há um consenso sobre a terapia antifúngica ideal para o tratamento da infecção. A avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos é uma forma de monitorar a resistência e optar por terapias com melhor resposta. Nesse intuito, o presente estudo avaliou a sensibilidade de sete isolados de *C. lamprauges* frente aos fármacos antifúngicos anfotericina B, voriconazol, miconazol e terbinafina, aos fármacos antibacterianos, sulfametoxazol+trimetoprima, azitromicina e dapsona, e ao fármaco antiprotozoário, miltefosina, de forma isolada e em associação, por meio do método de “checkerboard”, baseado na metodologia de microdiluição em caldo padronizada pelo documento M38-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Isoladamente, as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para anfotericina B, variaram de 0,25-1,0 µg/mL, para o miconazol 2,0-8,0 µg/mL, para a terbinafina 0,25-2,0 µg/mL, para o voriconazol 512 µg/mL, para sulfametoxazol+trimetoprima, 32/6,4-256/51,2 µg/mL, azitromicina >64, para a dapsona >32 µg/mL e para miltefosina 2-16 µg/mL. Altas taxas de sinergismo foram observadas nas combinações de miltefosina + azitromicina (100%), miltefosina + dapsona (100%), azitromicina + dapsona (85,7%). As associações de maior relevância merecem atenção como candidatas para o tratamento de infecções por *Conidiobolus spp.*. Assim sendo, estudos adicionais *in vitro* e *in vivo* com uma ampla gama de isolados clínicos e diferentes *Conidiobolus spp.* são necessários para entender melhor a suscetibilidade aos antimicrobianos descritos neste estudo.

**Palavras-chaves:** Conidiobolomicose. Teste de suscetibilidade. Terbinafina. Dapsona. Miltefosina.

## ABSTRACT

### **IN VITRO SUSCETIBILITY OF *Conidiobolus lamprauges* AGAINST ANTIMICROBIAL DRUGS**

AUTHOR: Josias da Rosa Stefanello  
ADVISOR: Prof. Dr. Janio Morais Santurio

Conidiobolomycosis is an important and difficult-to-treat infection. The disease is caused by the fungi *Conidiobolus coronatus*, *C. incongruus* and *C. lamprauges*, affecting sheep, horses, dogs and humans. There is no common understanding about the ideal antifungal therapy for the infection treatment. Assessment of antifungal susceptibility is one way of monitoring resistance and predicting appropriate therapies. Therefore, the present study assessed the sensibility of seven isolates of *C. lamprauges* considering the antifungal drugs Amphotericin B, voriconazole, miconazole and terbinafine, the antibacterial drugs sulfamethoxazole + trimethoprim, azithromycin and dapsona and the antiprotozoal drug miltefosine, in an isolated and in association manner, through the checkerboard method, by means of the broth microdilution method, which is standardized by the M38-A2 document, of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). In an isolated way, the minimum inhibitory concentrations (MICs), for Amphotericin B, vary in 0.25-1.0 µg/mL, to miconazole 2.0-8.0 µg/mL, to terbinafine 0.25-2.0 µg/mL, to voriconazole 512 µg/mL, to sulfamethoxazole + trimethoprim, 32/6.4-256/51.2 µg/mL, azithromycin >64, to dapsona >32 µg/mL and to miltefosine 2-16 µg/mL. Higher rates of synergism were observed in the combinations of miltefosine + azithromycin (100%), miltefosine + dapsona (100%), azithromycin + dapsona (85.7%). The most relevant associations deserve attention as candidates for *Conidiobolus spp.* infection treatment. Hence, further *in vitro* and *in vivo* studies with a wide range of clinical isolates and different *Conidiobolus spp.* are needed to better understand the susceptibility to the antimicrobials described in this study.

**Key words:** Conidiobolomycosis. Susceptibility. Testing. Terbinafine. Dapsona. Miltefosine.

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO

Tabela 1 – <i>In vitro</i> susceptibility of antibacterial, antiprotozoal and antifungal drugs alone and in combination against seven <i>Conidiobolus lamprauges</i> isolates <sup>b</sup> .....	43
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
ANI	Anidulafungina
AZI	Azitromicina
CAS	Caspofungina
CEM	Concentração efetiva mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTX	Cotrimoxazol
CTZ	Cetoconazol
CYP	Citocromo
DAP	Dapsona
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
FCT	Flucitosina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLZ	Fluconazol
ITZ	Itraconazol
MCZ	Miconazole
MFG	Micafungina
MTF	Miltefosina
PABA	Ácido para-aminobenzóico
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
POS	Posaconazol
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SMX	Sulfametoxazol
TMP	Trimetoprim
TRB	Terbinafina
VOR	Voriconazol

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO .....	13
<b>2.1.1 Epidemiologia</b> .....	14
<b>2.1.2 Características clínicas</b> .....	15
<b>2.1.3 Histologia e morfologia</b> .....	16
<b>2.1.4 Tratamento</b> .....	17
<b>2.1.5 Suscetibilidade</b> .....	19
2.2 ANTIFÚNGICOS .....	21
<b>2.2.1 Poliênicos</b> .....	23
2.2.1.1 <i>Anfotericina B</i> .....	23
<b>2.2.2 Azólicos</b> .....	24
2.2.2.1 <i>Miconazol</i> .....	25
2.2.2.2 <i>Voriconazol</i> .....	25
<b>2.2.3 Alilaminas</b> .....	26
2.2.3.1 <i>Terbinafina</i> .....	26
2.3 ANTIBACTERIANOS E MILTEFOSINA .....	27
<b>2.3.1 Sulfametoxazol-trimetoprima</b> .....	27
<b>2.3.2 Azitromicina</b> .....	28
<b>2.3.3 Dapsona</b> .....	29
<b>2.3.4 Miltefosina</b> .....	30
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	33
3.1 OBJETIVO GERAL .....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>4 MANUSCRITO</b> .....	34
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	44
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	45

## **ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO**

Essa dissertação encontra-se dividida em seis partes. A primeira diz respeito à introdução, a qual apresenta a temática abordada neste trabalho. A segunda parte tem relação com a revisão de literatura, baseando-se em estudos sobre o agente etiológico - epidemiologia, características clínicas, histologia e tratamento - e os fármacos - poliênicos, azólicos, entre outros. A terceira são os objetivos desta pesquisa.

Os materiais e métodos, resultados e discussão que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo e encontram-se na seção MANUSCRITO, assim como as referências bibliográficas citadas no artigo. Todavia o item referências encontradas no final deste trabalho referem-se as demais referências utilizadas. O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista *Medical Mycology*, na qual se encontra submetido.

Por fim, a última parte refere-se à conclusão deste estudo.

## 1 INTRODUÇÃO

A conidiobolomicose é uma infecção fúngica que causa rinite granulomatosa crônica no homem e nos animais, causada por fungos do gênero *Conidiobolus* (THOMAS et al., 2006; KWON-CHUNG, 2012). Estes fungos saprófitas são encontrados no solo em vegetação decomposta, principalmente em regiões de clima quente e úmido, e como parasita de insetos (HUMBER et al., 1989; RADOSTITS et al., 2009). Em animais e no homem, as espécies responsáveis por causarem a conidiobolomicose são: *Conidiobolus coronatus*, *C. incongruus* e *C. lamprauges* (HUMBER et al., 1989; MORRIS et al., 2001, BENTO et al., 2010).

A infecção ocorre principalmente pela inalação de conídios dos fungos encontrados no ambiente ou por meio de insetos infectados (HUMBER et al., 1989), sendo que, em pequenas lesões na mucosa nasal, ocorre a entrada para instalação e crescimento do conídio (HUMBER et al., 1989; THOMPSON, 2007).

São relatadas infecções em humanos (WÜPPENHORST et al., 2010), caninos (MACKEY et al., 2015), equinos, (STEIGER & WILLIAMS, 2000), suínos (EVANS et al., 2018), lhamas (FRENCAHN & ASHWOR, 1994) e ovinos (MORRIS et al., 2001).

Dois formas clínicas da doença têm sido descritas em ovinos. A forma rinofacial, que se caracteriza por um aumento de volume no vestíbulo nasal, união mucocutânea do nariz, pele do focinho, lábio superior e palato duro; e a forma nasofaríngea, que afeta, principalmente, a região etmoidal, faringe e seios paranasais (SILVA et al., 2007a; RIET-CORREA et al., 2008; WEIBLEN et al., 2016).

De maneira geral, os ovinos podem apresentar, como sinais clínicos: obstrução nasal, dispneia, secreção nasal, respiração ruidosa, assimetria craniofacial, exoftalmia, depressão e anorexia (MORRIS et al., 2001; BOABAID et al., 2008; RIET-CORREA et al., 2008; FURLAN et al., 2010; WEIBLEN et al., 2016).

Na análise macroscópica das lesões, são observadas proliferações de tecido amarelo de consistência mole e friável, nodulares e de superfície irregular (BOABAID et al., 2008; SILVA et al., 2007b; SILVA et al., 2010; AGUIAR, 2014).

Histologicamente, nessas massas, são notadas inflamação crônica granulomatosa multifocal, com centro necrótico, contendo hifas circundadas por material Splendori-Hoepli (RIET-CORREA et al., 2008; FURLAN et al., 2010).

Focos de conidiobolomicose têm sido descritos comumente em ovinos nos estados brasileiros do Piauí (SILVA et al., 2007b), Paraíba (PORTELA et al., 2010)

Rio Grande do Norte (AGUIAR et al., 2014) e Mato Grosso (BOABAID et al., 2008), gerando grandes perdas econômicas devido ao alto custo do tratamento dos animais infectados e também a perdas de animais devido ao diagnóstico tardio (DE PAULA et al., 2010). Nos estados do Rio Grande do Sul (PEDROSO et al., 2009) e Santa Catarina (FURLAN et al., 2010) a ocorrência nos rebanhos é esporádica (WEIBLEN et al., 2016).

Em vários relatos, a letalidade da conidiobolomicose em ovinos é de 100%, sendo ineficaz o tratamento comumente utilizado à base de iodetos. Além dos animais, para os humanos, não há um consenso sobre a terapia antifúngica ideal para infecções causadas por *Conidiobolus spp.*, pela falta de dados clínicos ou *in vitro* suficientes para se chegar a uma conclusão (CHOWDHARY et al., 2010).

A solução, saturada de iodeto de potássio, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, anfotericina B e terbinafina, tem sido usada em diferentes combinações com sucesso variável para humanos e animais (TADANO et al., 2005; FISCHER et al., 2008; CHOWDHARY et al., 2010; KIMURA et al., 2011).

Em testes de suscetibilidade *in vitro*, vários autores descrevem resistência ou suscetibilidade reduzida de *Conidiobolus spp.* a maioria dos fármacos antifúngicos testados (GUARRO et al., 1999; FISCHER et al., 2008; WÜPPENHORST et al., 2010; TONDOLO et al., 2013; TONDOLO et al., 2018).

Várias classes de agentes antibacterianos e antiprotozoários são estudados para uma possível utilização no tratamento de infecções fúngicas, com vários resultados positivos (HANAFY et al., 2007; BORBA-SANTOS et al., 2015). Alguns agentes possuem atividade antifúngica por si só, outros, aumentam a ação dos mais tradicionais agentes antifúngicos sem ação significativa como um único agente (JUDD & MARTIN, 2009).

Em resposta às falhas da terapêutica antifúngica, vários autores têm buscado estratégias que garantam o sucesso da atividade antifúngica contra *Conidiobolus spp.* (GUARRO et al., 1999; TONDOLO et al., 2013; TONDOLO et al., 2018).

Entre as estratégias, a combinação de fármacos tem merecido atenção, dessa maneira, ressalta-se a importância de analisar fármacos de diferentes classes isoladamente, na tentativa de identificar uma ação antifúngica e de analisar uma possível interação entre fármacos antifúngicos, antibacterianos e antiprotozoários.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

A conidiobolomicose é uma infecção fúngica causada por fungos pertencentes ao filo *Entomophthoromycota*, classe *Entomophthoromycetes*, ordem *Entomophthorales* e gênero *Conidiobolus* (HUMBER, 2012). Este microrganismo está associado como sendo a causa de uma doença crônica, granulomatosa na região nasal de homens e animais (CRUZ, 2010; KWON-CHUNG, 2012).

A ordem Entomophthorales inclui dois gêneros histologicamente semelhantes, mas clinicamente e micologicamente distintos: *Basidiobolus* e *Conidiobolus* e as doenças nos mamíferos causadas por esses microrganismos podem ser chamadas de entomofotoromicoses (FISCHER et al., 2008; CHOON et al., 2012). Além dos mamíferos, esses fungos são conhecidos por infectar insetos, contribuindo para o controle natural desses (CHOWDHARY et al., 2010; FISCHER et al., 2008).

As espécies responsáveis por causarem a conidiobolomicose são: *Conidiobolus coronatus*, *C. incongruus* e *C. lamprauges* (HUMBER et al., 1989; MORRIS et al., 2001, BENTO et al., 2010). Enquanto *C. coronatus* e *C. incongruus* são mais comumente descritos como a causa da doença, a infecção por *C. lamprauges* é a menos prevalente, mas foi descrita infectando equinos, sendo a primeira vez em uma égua árabe em 1989 (HUMBER et al., 1989).

Depois disso, em 2010, três novas publicações relatam o envolvimento dessa espécie com doença na cavidade nasal em ovinos (DE PAULA et al., 2010; FURLAN et al., 2010; VILELA et al., 2010) e, em 2011, foi descrito o primeiro caso dessa infecção fúngica causada por *C. lamprauges* em humanos (KIMURA et al., 2011).

No entanto, devido à informação limitada sobre a identificação adequada de *C. lamprauges* no laboratório e ao uso de ferramentas taxonômicas clássicas, é possível que algumas espécies de *Conidiobolus* podem ter sido mal identificadas (KIMURA et al., 2011).

### 2.1.1 Epidemiologia

*Conidiobolus spp.* é um fungo filamentosos e saprófita, podendo ser encontrado no solo e plantas em decomposição, sendo que as regiões de clima quente e úmido (tropical e subtropical) são as mais favoráveis ao crescimento das hifas, por conter justamente solos úmidos e com grande quantidade de matéria orgânica (HUMBER et al., 1989; THOMPSON, 2007; RADOSTITS et al., 2009; BENTO et al., 2010).

Diante disso, a doença ocorre principalmente nas regiões tropicais da África, da América do Sul e Central, no sudeste da Ásia e da Índia. No Brasil, os maiores números de animais infectados encontram-se nas regiões nordeste e centro-oeste (BENTO et al., 2010; CHOWDHARY et al., 2010; ISA-ISA et al., 2012; WEIBLEN et al., 2016). Entretanto foi descrita em outros estados (WEIBLEN et al., 2016).

A infecção de humanos e animais ocorre por implantação dos conídios do fungo inalados do ambiente ou ainda por pequenas lesões na cavidade nasal causada por insetos infectados ou fragmentos firmes de pasto (HUMBER et al., 1989; GUGNANI, 1992).

Conidiobolomicose não é uma doença contagiosa, uma vez que o ambiente é a fonte de todas as infecções e está relacionada principalmente à exposição a um elevado número de conídios presentes nos locais de foco. Ainda é observado que o comprometimento imunológico nos animais não é necessário para ocorrer a doença (HUMBER et al., 1989; THOMPSON, 2007).

Silva et al. (2007b) determinam aspectos epidemiológicos da conidiobolomicose em ovinos no Piauí, relacionando o maior número de focos a alta frequência de chuvas em um período curto de tempo, associada com altas temperaturas observadas na região. Desta forma, ocorreriam três fatores importantes para o desenvolvimento do fungo: umidade, temperatura e presença de material vegetal em decomposição.

Aguiar (2014) aponta aspectos epidemiológicos semelhantes e descreve, ainda, que no período seco, os animais também se infectam ao pastar pelas margens de açudes. Também assinala que ovinos são mais acometidos que outros animais por terem um hábito de pastejo mais baixo, o que favorece a contaminação através da inalação dos esporos do chão.

Infecções por *Conidiobolus spp.* em equinos são menos comuns do que em seres humanos, mas também tendem a ser restritos para os climas quentes. Equinos

e outros animais podem se infectar ao dormir em camas de material vegetal, que se úmido poderia fornecer habitat ideal para o crescimento de *Conidiobolus spp.* (HUMBER et al., 1989).

Em seres humanos, Gugnani, (1992), por meio de levantamento de dados, demonstra que a doença geralmente afeta adultos com idade entre 20 e 60 anos, que trabalham parcial ou totalmente na área agrícola e a taxa de incidência da doença é oito vezes maior para homens do que para mulheres.

### **2.1.2 Características clínicas**

A manifestação clínica da conidiobolomicose em animais pode ocorrer de duas formas clínicas. A primeira é a rinofacial que se caracteriza por aumento de volume das áreas próximas ao vestíbulo nasal, união mucocutânea do nariz, pele do focinho, lábio superior e palato duro (SILVA et al., 2007a; RIET-CORREA et al., 2008).

A outra forma é denominada nasofaríngea, sendo a mais comum e que afeta principalmente a região etmoidal, conchas nasais, seios paranasais, palato mole, faringe, podendo se estender para a órbita ocular e região anterior do cérebro (DE PAULA et al., 2010; SILVA et al., 2007a).

Em seres humanos, a infecção começa com um nódulo nasal que cresce lentamente com o tempo e os sintomas podem levar vários meses ou anos para aparecerem (BENTO et al., 2010; ISA-ISA et al., 2012). Geralmente, a obstrução nasal ocorre primeiro, seguida de uma difusa infiltração eritematosa, com espessamento da pele no nariz (ISA-ISA et al., 2012). Após isso, ocorre um aumento importante no volume e uma deformidade das estruturas faciais centrais. Em estágios tardios, a faringe, as camadas musculares do rosto e os seios paranasais também podem estar envolvidos (ISA-ISA et al., 2012).

Por conta das alterações das características faciais nas etapas avançadas da infecção, é descrito que os pacientes ficam com "aparência de hipopótamo" (FISCHER et al., 2008).

Em humanos as lesões geralmente são firmes e anexadas a estruturas e tecidos subjacentes, mas não ligada à pele. Essa doença tipicamente ocorre sem angioinvasão e a infecção espalha-se localmente, mas, em casos raros, ela pode ser disseminada, principalmente quando ocorre em humanos ou animais imunodeprimidos (GUGNANI, 1992).

Em casos de infecção disseminada, a doença atingiu órgãos em seres humanos como pulmões, coração, rins, glândula tireoide e baço (WALKER et al, 1992; KIMURA et al., 2011), enquanto que em cães e equinos, os órgãos atingidos foram a traqueia e os pulmões (STEIGER & WILLIAMS, 2000; HAWKINS et al., 2006).

De maneira geral, os sinais clínicos em animais infectados são obstrução nasal, dispneia, secreção nasal, respiração ruidosa, assimetria craniofacial, exoftalmia, depressão e anorexia (MORRIS et al., 2001; SILVA et al., 2007a; BOABAID et al., 2008; RIET-CORREA et al., 2008; FURLAN et al., 2010).

Geralmente, os sinais apresentados em seres humanos são edema facial, congestionamento e bloqueio nasal progressivo, seguido de aumento de volume gradual e indolor do nariz e extremidades, com descarga nasal (THOMAS et al., 2006; CHOON et al., 2012).

### **2.1.3 Histologia e morfologia**

Em necropsias de ovinos as lesões macroscópicas descritas são proliferações de tecido amarelo-brancacento de aspecto tumoral, consistência mole e friável, nodulares e de superfície irregular (SILVA et al., 2007b; SILVA et al., 2010; AGUIAR, 2014).

Pelo exame histológico, através da coloração com hematoxilina e eosina verifica-se que as massas consistem de extensas áreas de reação inflamatória caracterizada por granulomas multifocais e coalescentes, com proliferação de tecido conjuntivo, infiltrado de neutrófilos, linfócitos, células epitelióides, células gigantes e grande quantidade de eosinófilos, frequentemente circundando áreas de necrose caseosa com hifas no centro circundadas pela reação de Splendore-Hoeppli (RIET-CORREA et al., 2008; FURLAN et al., 2010; SILVA et al., 2010; AGUIAR, 2014).

No entanto, é observada uma cronicidade nas lesões por meio da histopatologia, isso indica que a doença leva um tempo considerável para se desenvolver nos tecidos infectados (RIET-CORREA et al., 2008; RADOSTITS et al., 2009).

Microscopicamente, as colônias de *C. lamprauges*, apresentam hifas hialinas, cenocíticas, tipo fita, não ramificadas, com tamanho de 5 a 10 µm de diâmetro, com poucos septos, geralmente, nas partes distais das hifas (VILELA et al., 2010).

Algumas hifas ainda podem mostrar dilatação balonosa na extremidade (KIMURA et al., 2011; DE PAULA et al., 2010).

Nos tecidos de biópsias, hifas podem ser identificadas pela coloração de prata metenamina de Grocott e de ácido periódico de Schiff (ISA-ISA et al., 2012; UBIALI et al., 2013).

O isolamento do fungo é feito em ágar Sabouraud dextrose e ágar batata dextrose, onde o crescimento é evidente dentro de 24 horas e cobrem toda placa a partir de 5-7 dias. Colônias de *C. lamprauges* são descritas como planas de coloração creme, lisas nos primeiros dias, tornando-se rugosas e firmemente aderidas ao ágar após alguns dias, o fungo cresce bem no escuro a 37°C (HUMBER et al., 1989).

Muitas vezes, o diagnóstico da conidiobolomicose não chega a ser feito e quando é realizado, é baseado em histopatologia, isolamento e cultura do agente etiológico (GUGNANI, 1992; BENTO et al., 2010). Ressalta-se que técnicas histológicas confirmam a presença de fungo, mas não possibilitam diferenciar a espécie (CHOON et al., 2012).

O microrganismo *Pythium insidiosum* também pode estar associado como a causa de rinite rinofacial ou rinofaríngea em ovinos (UBIALI et al., 2013). A confirmação do diagnóstico e diagnóstico diferencial pode ser feita por meio de técnicas moleculares, tais como, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento gênico (DNA ribossomal 18S) (DE PAULA et al., 2010; SILVEIRA et al., 2013), e ainda por meio do exame de imuno-histoquímica (UBIALI et al., 2013).

#### **2.1.4 Tratamento**

Dados mostram que o tratamento da conidiobolomicose em ovinos é considerado ineficaz, de acordo com relatos de autores afirmando 100% de letalidade dos ovinos doentes (FURLAN et al., 2010; AGUIAR 2014; SILVA et al., 2007b).

Em um foco onde a doença afetou 12 ovinos, em uma propriedade no estado do Mato Grosso, todos os doentes morreram com curso clínico de 2-5 semanas, desses animais, três foram tratados com 1 grama de iodeto de potássio por até 15 dias, sem resultados (BOABAID et al., 2008).

Em outro caso com uso do mesmo fármaco, Riet-correa et al. (2008) descreveram tratamento de um ovino, por via oral com iodeto de potássio (7 mg/Kg), com redução da lesão após cinco dias de tratamento, no entanto, o animal morreu.

Em outro ovino doente, relatado no mesmo trabalho, iodeto de potássio foi administrado via oral durante dois meses e localmente com spray de cetoconazol 2% por mais três meses, no entanto o animal piorou e foi sacrificado após um curso clínico de 6 meses.

Portela et al. (2010), no estado da Paraíba, descreveram sete focos de conidiobolomicose, onde o tratamento em seis dos oito ovinos doentes consistiu no uso de fluconazol (10mg/kg), mas sem sucesso. Também, tratamento com sulfametoxazol-trimetoprim (44 mg/kg) não foi eficiente para três ovinos em um caso ocorrido na Índia (MORRIS et al., 2001).

Após os sinais clínicos iniciais, em média, os ovinos levam de 7-15 dias para morrer ou ser feita a eutanásia por falta de condições de recuperação (THOMPSON, 2007; RIET-CORREA et al., 2008). O rápido curso da doença após aparecerem os sinais clínicos é provavelmente a razão pela qual o tratamento com iodeto de potássio não é eficaz para ovinos (RIET-CORREA et al., 2008).

Em equinos, Steiger & Williams (2000) descreveram um tratamento com sucesso onde foi utilizado iodeto de sódio (20%) durante sete dias e iodeto orgânico (Etilenodiamina hydroiodide 4,57%) durante mais de um ano. Em outro caso duas éguas prenhas foram tratadas com fluconazol, obtendo sucesso, com a redução dos sinais clínicos vista poucos dias após o início do tratamento, que foi interrompido após 6 e 8 semanas (TAINTOR et al., 2004).

Em um cão com conidiobolomicose na região nasal e pulmonar, a terapia com itraconazol (10 mg/kg) foi considerada surpreendente, dado o fato de o animal receber terapia imunossupressora durante tratamento inicial da pneumonia fúngica e estar com quimioterapia em curso. Além disso, o isolado fúngico era resistente a itraconazol (CIM >8 µg/mL) e fluconazol (>64 µg/mL) em testes de suscetibilidade *in vitro* (HAWKINS et al., 2006). Em outro canino, Bauer et al. (1997) descreveram tratamento eficiente somente com itraconazol.

Além dos animais, também não há um consenso sobre a terapia antifúngica ideal em humanos para infecções causadas por *Conidiobolus spp.*, pois a doença é infrequente relatada (CHOWDHARY et al., 2010). A escolha do melhor agente antifúngico, com sua dosagem e sua duração, permanece incerta; no entanto, a solução saturada de iodeto de potássio, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, anfotericina B e terbinafina têm sido usadas em diferentes combinações com sucesso

variável (TADANO et al., 2005; FISCHER et al., 2008; CHOWDHARY et al., 2010; KIMURA et al., 2011).

Por outro lado, existem relatos de casos em que o tratamento foi positivo, um paciente foi tratado com terbinafina (250 mg/dia) e itraconazol (200 mg/dia) por um período de 12 meses, apesar do isolado ter mostrado resistência nos testes de suscetibilidade *in vitro* à anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol e terbinafina (FISCHER et al., 2008). Em outro caso, o tratamento foi eficiente somente com itraconazol, em uma infecção causada por *C. coronatus* (HANDA et al., 2000).

Tadano et al. (2005) mostraram uma resposta adequada ao tratamento da conidiobolomicose em humanos com cetoconazol em combinação com solução saturada de iodeto de potássio durante seis meses, porém o seu relato não descreve até a cura total do paciente. Esse é o primeiro caso da infecção causada por *C. coronatus*, ocorrido no Mato Grosso, Brasil. Em outros casos, iodeto de potássio foi combinado com itraconazol (ARORA; BHARGAVA & RAI, 2016) e ainda com itraconazol e infusão intravenosa de anfotericina B, (CHOWDHARY et al., 2010), apresentando em todos bons resultados.

Se o tratamento para os seres humanos for precoce e adequado, o prognóstico será bom e a mortalidade será incomum. A duração do tratamento geralmente é por longos períodos e as deformidades faciais, em alguns casos, precisam ser corrigidas com cirurgia (ISA-ISA et al., 2012).

### **2.1.5 Suscetibilidade**

Os testes de suscetibilidade tornam-se necessários por se constituírem em um guia para a seleção de antifúngicos, e para fornecerem dados consistentes que permitam prever, com o conjunto de outros dados, a resposta clínica dos pacientes (ROCHA & SIDRIM, 2004).

O protocolo M38-A2 representa a técnica padrão para avaliar a suscetibilidade de fungos filamentosos frente a compostos antifúngicos (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008). Apesar desse método ter sido padronizado para outros fungos filamentosos, essa técnica foi fundamental para o reconhecimento de isolados com variados perfis de suscetibilidade de *Conidiobolos spp.* (KIMURA et al., 2012; TONDOLO et al., 2013; TONDOLO et al., 2018).

Para avaliar combinações de agentes antimicrobianos contra microrganismos, pesquisadores utilizam comumente o método de “checkerboard” (MOODY, 2007).

Dados sobre a suscetibilidade de *Conidiobolus lamprauges* frente a antifúngicos comumente utilizados são escassos, mas alguns autores como Guarro et al. (1999) descrevem a suscetibilidade de um isolado de *C. lamprauges*, na qual demonstrou ser resistente a todos os agentes antifúngicos testados, com CIM 100% de 8 µg/mL para a AMB, cetoconazol (CTZ) e miconazol (MCZ), 32 µg/mL para fluconazol (FLZ) e itraconazol (ITZ) e 256 µg/mL para flucitosina (FCT).

Kimura et al. (2011) determinaram a suscetibilidade de um isolado de *C. lamprauges*, recuperado de uma infecção disseminada em humano e encontraram CIM 100% (24 e 48 hrs) para ITZ (0,5 e 1 µg/ml), CIM 50% para MCZ (0,25 e 1 µg/ml), e TRB (0,03 e 0,125 µg/mL), enquanto resistência foi observada, (CIM 100%) para AMB (4 e 8 µg/mL) posaconazol (POS) (4 e 4 µg/ml) e VOR (>16 µg/mL), a concentração efetiva mínima (CEM) para anidulafungina (ANI), caspofungina (CAS), micafungina (MFG) foi (>8 µg/mL) Além disso, os testes de sinergismo entre ITZ / TRB e POS / TRB foram interpretados como indiferentes.

Tondolo et al. (2013), em testes *in vitro* para seis cepas de *C. lamprauges* isoladas de casos em ovinos, demonstraram que as cepas apresentaram resistência ou reduzida suscetibilidade aos fármacos, sendo CIM 100%, os resultados (após 48 hrs) foram para AMB (1 µg/mL), ITZ (1-32 µg/mL), POS (2->32 µg/mL) e VOR (>16 µg/mL), CIM 50% para CTZ (8-32 µg/mL), FLZ e FCT (>64 µg/mL), e CEM para ANI, CAS e MFG (>8 µg/mL), sendo a TRB (CIM 80%, 0.06-05 µg/mL) o único fármaco que demonstrou resultados mais satisfatórios.

Outro trabalho semelhante testou *in vitro*, vários fármacos para as mesmas cepas de *C. lamprauges* do trabalho anterior e demonstrou os melhores efeitos (CIM 100%), para AMB (1-2 µg/ml), TRB (1-4 µg/ml) e MCZ (4-16 µg/ml), outros fármacos não foram eficazes, como ANI (>512 µg/ml), CAS (256 ->512 µg/ml), CTX (32 - 256 µg/ml), MFG (64-256 µg/ml), POS (>32 µg/ml), SMX (128-1024 µg/ml), TMP (256-512 µg/ml), VOR (>512 µg/ml). Ainda, mostrou interações sinérgicas de 100% para a combinação de sulfametoxazol e trimetoprima, de 71% para as combinações antifúngicas de TRB e azólicos (miconazol, posaconazol e voriconazol) e de 29% para a combinação de TRB / MFG (TONDOLO et al., 2018).

Embora tenham muitos relatos de resistência *in vitro*, os testes de suscetibilidade para *Conidiobolus spp.* devem ser interpretados com cautela, assim

como as pesquisas que demonstram resultados similares e discordantes quando observado em estudos que descrevem a suscetibilidade de *C. coronatus* (GUARRO et al., 1999; FISCHER et al., 2008; BENTO et al., 2010) e *C. incongruus* (GUARRO et al., 1999; TEMPLE et al., 2001; WÜPPENHORST et al., 2010).

Fischer et al. (2008) descreve um caso de infecção em humano por *C. coronatus*, em que um paciente foi tratado com TRB e ITZ por um período de 12 meses, obtendo sucesso, apesar do isolado ter mostrado resistência nos testes de suscetibilidade *in vitro* a TRB, ITZ, AMB, FLZ, VOR.

Em outro caso de infecção em humano por *C. coronatus*, Bento et al. (2010) mostra em teste *in vitro* de suscetibilidade, baixas CIMs para FLZ e VOR (0,5 e 0,125 µg/mL, respectivamente) e moderada sensibilidade para iodeto de potássio (21750 µg/mL), no caso em questão, o paciente foi tratado com FLZ, solução saturada de iodeto de potássio e sulfametoxazol-trimetoprima, com sucesso.

Para um isolado de *C. incongruus* de infecção em humano, o teste *in vitro* de suscetibilidade demonstrou baixa CIM, somente para sulfametoxazol-trimetoprima (1 µg/mL), para outros fármacos a CIM foi  $\geq 32$  µg/mL para VOR, POS, AMB, CAS e  $\geq 256$  µg/mL de FLZ, neste caso foi utilizado o método do Etest (WÜPPENHORST et al., 2010).

Outro isolado identificado como *C. incongruus*, de um caso em humano, demonstrou resistência a AMB CIM 4 e 8 µg/ml às 24h e 48h, CTZ 16 µg/ml e  $\geq 16$  µg/ml às 24h e 48h, FTC  $\geq 64$  µg/ml às 24h e ITZ que mostrou as menores CIMs 1 e 8 µg/ml às 24h e 48h. Para melhora do paciente, foi necessária uma combinação de terapia antifúngica, oxigênio hiperbárico e cirurgia (TEMPLE et al., 2001).

Apesar da sua suscetibilidade reduzida ou resistência nas avaliações *in vitro*, existem fatores indefinidos para compreensão da relação entre a suscetibilidade e o tratamento da conidiobolomicose.

## 2.2 ANTIFÚNGICOS

As infecções fúngicas causadas por leveduras e fungos representam um problema crescente nos cuidados de saúde (PIERCE et al., 2010). Um número limitado de fármacos pode ser utilizado no tratamento das infecções micóticas. A maioria apresenta uma ou mais limitações, como efeitos colaterais acentuados,

estreito espectro antifúngico, pouca penetração em certos tecidos e seleção de fungos resistentes (MITCHELL, 2012).

Apesar da disponibilidade de agentes antifúngicos, a incidência de micoses e a complexidade do tratamento podem ser atribuídas, principalmente, ao desenvolvimento de resistência à terapia com antifúngicos (LOPEZ-RIBOT & RAMASUBRAMANIAN, 2014).

Além disso, o desenvolvimento de novos fármacos é difícil, pois os fungos são organismos eucarióticos como os mamíferos e, com exceção da parede celular, as células fúngicas apresentam muitas semelhanças com as do hospedeiro, o que dificulta encontrar um alvo específico que possa ser explorado para ação de novos agentes (KANAFANI & PERFECT, 2008; SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT & RAMASUBRAMANIAN, 2014).

O primeiro fármaco desenvolvido, com ação antifúngica específica, foi o iodeto de potássio, utilizado desde 1903 na terapêutica da esporotricose e, até hoje, é considerado o fármaco de primeira escolha nesta micose. Na década de 1930, as sulfas surgiram como um novo suporte, em 1939 surgiu a griseofulvina e, na década de 1950, surgiram os derivados poliênicos como a nistatina e a anfotericina B (ROCHA & SIDRIM, 2004; TAVARES, 2014).

Na mesma época (1964), foi descoberta a ação antimicótica de um derivado pirimidínico, a flucitosina que ampliou a terapia para micoses profundas. Duas décadas mais tarde, houve um grande avanço com o desenvolvimento dos derivados azólicos com formulações intravenosas e orais (ROCHA & SIDRIM, 2004; TAVARES, 2014).

Foram, então, sintetizadas numerosas substâncias, surgindo então, os derivados imidazólicos, como o miconazol (1967), isoconazol (1979), cetoconazol (1981), oxiconazol (1986) entre outros. Posteriormente a isso, surgiram os derivados triazólicos como o fluconazol (1990), itraconazol (1992) e voriconazol (2002) (ROCHA & SIDRIM, 2004).

A partir da década de 1990, surgiram os derivados morfolínicos, como a amorolfina (1994), empregada principalmente no tratamento de onicomicoses e as alilaminas, representadas pela naftifina e terbinafina (1993) (ROCHA & SIDRIM, 2004; CRUZ, 2010). Por último, em 2001, a Food and Drug Administration (FDA) liberou a caspofungina, membro da classe das equinocandinas, para uso clínico em pacientes (ROCHA & SIDRIM, 2004).

A suscetibilidade dos patógenos fúngicos à ação de medicamentos são frequentemente medidas e interpretadas usando *breakpoints* apropriados, padronizada pelo Clinical Laboratory Standards Institute. Uma das técnicas adotadas é a de microdiluição em caldo desenvolvidas nas décadas de 1980 e 1990 (ROCHA & SIDRIM, 2004; CRUZ, 2010).

### 2.2.1 Poliênicos

A nistatina e anfotericina B são os dois antibióticos poliênicos disponíveis no mercado, atuando de forma semelhante sobre a membrana celular fúngica e provocando um aumento de sua permeabilidade seletiva. Como consequência, ocorre extravasamento de pequenas moléculas e eletrólitos, como o potássio, para o exterior das células, alterando a homeostase (CRUZ, 2010).

#### 2.2.1.1 Anfotericina B

Anfotericina B é um antifúngico obtido de um actinomiceto, *Streptomyces nodosus* (LACAZ et al., 2002; SHEPPARD & LAMPIRIS, 2002). Considerada terapia padrão para micoses sistêmicas graves (PATTERSON, 2006; MITCHELL, 2012), a anfotericina B é quase insolúvel em água, precisando ser, portanto, preparada na forma de suspensão coloidal de anfotericina B e desoxicolato sódico para injeção intravenosa (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2002; BENNETT, 2010).

A anfotericina B é seletiva no seu efeito fungicida, visto que distingue a diferença na composição lipídica das membranas celulares dos fungos e das células de mamíferos. O ergosterol, um esterol da membrana celular, é encontrado na membrana celular dos fungos, enquanto o colesterol constitui o esterol predominante encontrado nas células humanas (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2002; MITCHELL, 2012).

A anfotericina B liga-se ao ergosterol e altera a permeabilidade da célula ao formar poros associados ao fármaco na membrana celular. O poro permite o extravasamento de íons e macromoléculas intracelulares, levando à morte da célula (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2002; MITCHELL, 2012).

A anfotericina B possui atividade clínica útil contra *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*,

*Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides braziliensis*, *Aspergillus spp.*, *Talaromyces marneffe* e contra os agentes da mucormicose (BENNETT, 2010).

### 2.2.2 Azólicos

A exigência de administração intravenosa e a toxicidade dos agentes antifúngicos mais antigos geraram a necessidade de desenvolver agentes antifúngicos com melhor perfil terapêutico. Os azólicos orais relativamente atóxicos representam o primeiro grande avanço nesse sentido (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2002).

Denomina-se azólico, um composto químico heterocíclico aromático com cinco átomos, no qual átomos de carbono são substituídos por átomos de nitrogênio (TAVARES, 2014). Os azólicos são classificados em imidazóis ou triazóis, de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azol. Os imidazóis incluem o cetoconazol, miconazol e o clotrimazol e os triazóis incluem o itraconazol, fluconazol e o voriconazol (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2002).

Esses compostos compartilham o mesmo espectro antifúngico e mecanismo de ação. Os triazóis sistêmicos são metabolizados mais lentamente e exercem menos efeitos sobre a síntese de esteróis humanos que os imidazóis (BENNETT, 2010).

A atividade antifúngica dos azólicos é por meio da inibição da 14- $\alpha$ -esterol desmetilase, uma enzima microssômica do citocromo P-450. Com isso, os azólicos comprometem a biossíntese do ergosterol na membrana citoplasmática e levam ao acúmulo de 14- $\alpha$ -metilesteróis, podendo desagregar o arranjo compacto das cadeias acil dos fosfolipídios e comprometendo as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados à membrana, como adenosinatrifosfatases e as enzimas do sistema de transporte de elétrons, inibindo, assim, o crescimento dos fungos (BENNETT, 2010).

Nas células dos mamíferos, o citocromo P450 é um precursor do colesterol, mas os azóis possuem uma maior afinidade pelas enzimas do citocromo P450 fúngico do que pelas enzimas dos seres humanos (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2002). Além disso, o citocromo P450 dos fungos é cerca de 100 a 1000 vezes mais sensível aos azólicos do que o presente nos sistemas dos mamíferos (MITCHELL, 2012).

### 2.2.2.1 Miconazol

O miconazol é um imidazol de amplo espectro de ação antifúngica e antibacteriana, particularmente em cocos Gram-positivos (*Estafilococos* e *Streptococos*). Este antifúngico é utilizado comumente por via tópica e é pouco usado por via intravenosa, sendo que essa via é restrita ao tratamento de infecções sistêmicas graves (COSTA & GÓRDIK, 2011).

Quando aplicado topicamente, é absorvido de forma rápida pelo extrato córneo da pele e persiste por mais de quatro dias após sua aplicação (BENNETT, 2010; COSTA & GÓRDIK, 2011). Nesse modo de aplicação, a absorção pelo sangue é de menos de 1% e menos de 1,3% quando aplicado na vagina (BENNETT, 2010).

Pela via oral somente 20 a 30% é absorvido, pelo fato de ter uma absorção pelo tubo digestivo não satisfatória é administrado endovenosamente, quando do emprego da via parenteral (LACAZ et al., 2002).

Uma das grandes desvantagens da administração parenteral do miconazol refere-se a meia-vida plasmática muito curta devendo ser administrado a cada 8 horas (COSTA & GÓRDIK, 2011). Isso se dá pelo fato desse composto ser rapidamente metabolizado no fígado a produtos inativos (TAVARES, 2014).

Este fármaco atinge concentrações terapêuticas nos ossos, nas articulações e no tecido pulmonar, mas no sistema nervoso central, a penetração é mínima (COSTA & GÓRDIK, 2011).

Miconazol mostra-se ativo contra os dermatófitos (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*), *Candida albicans*, *Malassezia furfur*, *Coccidioides*, *Aspergillus*, *Cryptococcus neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis* (TAVARES, 2014).

### 2.2.2.2 Voriconazol

O voriconazol é um triazol com amplo espectro de ação contra vários agentes fúngicos, verificando-se atividade comparável ou superior a anfotericina B, itraconazol e fluconazol (LACAZ et al., 2002). Sua biodisponibilização oral é próxima a 100% (CATALAN & MONTEJO, 2006; DOLTON et al., 2014), podendo ser administrado por via oral e venosa (MITCHELL, 2012). Além disso, atinge níveis sanguíneos elevados,

sua meia vida sérica é de seis horas e sua ligação proteica é de 65% (TAVARES, 2014).

Distribui-se pelos líquidos e tecidos orgânicos, alcançando o dobro de concentração terapêutica no sistema nervoso central, se comparada à da concentração sanguínea e no líquido cefalorraquidiano 50% da concentração sanguínea (TAVARES, 2014).

Seu metabolismo é por meio das citocromos (CYP) hepáticas, particularmente a CYP2C19, a CYP2C9 em menor grau e a CYP3A4, as quais desempenham um papel limitado (BENNETT, 2010).

Os efeitos colaterais são elevações das provas de função hepática, bem como raros casos de hepatite e perturbações visuais reversíveis em cerca de 30% dos pacientes (MITCHELL, 2012).

O voriconazol é indicado principalmente para o tratamento de aspergilose invasiva, infecções invasivas graves causadas por *Candida*, incluindo candidemia e candidíase esofágica (inclusive por *C. krusei*) e infecções produzidas por *Lomentospora spp.* (*Pseudallescheria boydii*) e *Fusarium spp.* (TAVARES, 2014).

### 2.2.3 Alilaminas

As alilaminas inibem o crescimento de fungos através do bloqueio específico da biossíntese da enzima esqualeno epoxidase, que tem participação importante nas etapas iniciais do metabolismo biossintético do ergosterol. Como consequência, elas provocam o acúmulo de esqualeno na parede celular do fungo, causando toxicidade e morte celular. Naftifina e terbinafina são as duas substâncias farmacologicamente ativas nesse grupo (KYDER, 1992; CRUZ, 2010; COSTA & GÓRDIK, 2011).

#### 2.2.3.1 Terbinafina

Terbinafina é extensivamente usado na prática clínica e é ativa no tratamento de dermatofitos e onicomicose (DÜRRBECK & NENOFF, 2016). É um fungicida ceratinofílico e bastante lipofílico que, ao ser administrado por via oral, é rapidamente absorvido e captado pela pele, unhas e tecido adiposo (COSTA & GÓRDIK, 2011).

Por via oral, as concentrações plasmáticas máximas são atingidas 2 horas após a administração e sua biodisponibilidade é cerca de 70% (ROCHA & SIDRIM, 2004).

Mais de 99% do fármaco no plasma ligam-se às proteínas, podendo ser encontrada no plasma 4 a 8 semanas após a terapia prolongada (BENNETT, 2010).

A terbinafina é metabolizada pelo fígado, mas sua biotransformação utiliza menos de 5% da capacidade do sistema microsomal hepático e seus metabólitos são excretados predominantemente na urina (ROCHA & SIDRIM, 2004).

A posologia é de 250 mg/dia durante o período de, aproximadamente, doze semanas para casos de onicomicose (LACAZ et al., 2002). Os efeitos colaterais não são comuns, mas consistem em distúrbios gastrointestinais, cefaleia, reações cutâneas e perda de paladar (MITCHELL, 2012).

A terbinafina está indicada no tratamento das dermatofitoses provocadas por espécies dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Candida*, ainda pitíriase versicolor e das onicomicoses, utilizada por vias oral e tópica (CRUZ, 2010; TAVARES, 2014).

## 2.3 ANTIBACTERIANOS E MILTEFOSINA

### 2.3.1 Sulfametoxazol-trimetoprima

Sulfametoxazol é uma sulfonamida e foi o primeiro agente quimioterápico eficaz a ser utilizado por via sistêmica na prevenção e na cura de infecções bacterianas no homem (1932). A introdução da combinação de trimetoprima e sulfametoxazol ocorreu em 1970, proporcionando a possibilidade de cura para diversas infecções que já não eram debeladas com o uso isolado da sulfa (PETRI, 2010a; TAVARES, 2014).

O mecanismo de ação dessa associação de antimicrobianos fundamenta-se na inibição sequencial da síntese de ácidos nucleicos e de proteínas. Assim, as sulfonamidas inibem as sintetases que transformam o ácido para-aminobenzóico (PABA) em ácido fólico, e a trimetoprima bloqueia a diidrofolato redutase que reduzem o ácido fólico a ácido folínico, impedindo, dessa forma, a formação dos ácidos nucléicos (PETRI, 2010a; TAVARES, 2014). Em consequência da ação sobre a síntese do DNA, as bactérias deixam de se reproduzir e o bloqueio da síntese do RNA causa a inibição da formação de proteínas (TAVARES, 2014).

A trimetoprima é uma trimetoxibenzilpirimidina altamente seletiva ao inibir a diidrofolato redutase de bactérias, sendo eficiência 50.000 vezes mais em comparação com a mesma enzima das células de mamíferos (CHAMBERS, 2002).

Sulfametoxazol-trimetoprima pode ser administrada por via oral e intravenosa, apresentando perfil farmacocinético semelhante e a meia-vida sérica das drogas é de aproximadamente 12 horas (TAVARES, 2014).

Cerca de 65-70% de cada componente está ligado a proteínas e como a trimetoprima é mais lipossolúvel do que o sulfametoxazol, ela possui maior distribuição do que esta última droga. Por conseguinte, quando se administra uma parte de trimetoprima com 5 partes de sulfametoxazol, as concentrações plasmáticas máximas situam-se na faixa de 1:20, um valor ótimo para os efeitos combinados desses fármacos *in vitro* (CHAMBERS, 2002).

Sulfametoxazol-trimetoprima é utilizado para tratamento de infecções das vias urinárias por shigelose e salmonelose, bem como por outras bactérias Gram-negativas (BROOKS & CARROLL, 2012). Como antifúngico, a sulfametoxazol-trimetoprima apresenta ação contra espécies como de *Pneumocystis*, *Paracoccidioides* e *in vitro* contra *Aspergillus*, *Cryptococcus* e *C. incongruus* (HANAFY et al., 2007; WÜPPENHORST et al., 2010; BORGES et al., 2014; CREEMERS-SCHILD et al., 2016; ZHANG et al., 2018). Para cepas de *C. lamprauges*, em teste de suscetibilidade *in vitro*, a combinação de sulfametoxazol e trimetoprima mostrou interação sinérgica de 100% (TONDOLO et al., 2018).

### 2.3.2 Azitromicina

A azitromicina pertence ao grupo dos antibióticos macrolídeos, que são agentes bacteriostáticos por bloquearem a síntese proteica bacteriana. As drogas ligam-se à subunidade 50S do ribossomo e impedem a transferência dos aminoácidos conduzidos pelo RNA de transporte para a cadeia polipeptídica em formação (PETRI, 2010b; TAVARES, 2014).

O fármaco administrado por via oral é rapidamente absorvido e distribui-se amplamente por todo organismo, exceto no cérebro e no líquido cefalorraquidiano (PETRI, 2010b). Altas concentrações do fármaco são encontrados em tecidos como amígdalas, pulmão, próstata, fígado, gânglios linfáticos e no interior das células (incluindo fagócitos) e concentrações relativamente baixas em gordura e músculo (LODE, 1991).

Os antibióticos azalídeos distinguem-se dos outros antibióticos por sua farmacocinética incomum, a qual apresenta altas concentrações nos tecidos e com

meia vida longa (LODE, 1991). A ligação proteica da azitromicina é de 30% a 50%, sua meia-vida sérica é de 14 a 20 horas, enquanto nos tecidos mantém-se por até 60 horas, o que permite sua utilização em dose única diária. Também, nos tecidos, a azitromicina atinge concentração 10 a 50 vezes maiores do que a do sangue (TAVARES, 2014).

Os efeitos adversos com uso dos macrolídeos são relativamente baixos, sendo os mais comuns a irritação no local de administração, quando intramuscular ou intravenosa e os sintomas gastrointestinais como dor abdominal, diarreia e náuseas (HOPKINS, 1991; SPINOSA, 2011).

A azitromicina é utilizada no tratamento de infecções respiratórias e dermatológicas causadas por estafilococos e estreptococos e nas infecções respiratórias provocadas por *Haemophilus influenzae* e *Bordetella pertussis* (HOPKINS, 1991; TAVARES, 2014).

Contra fungos, a azitromicina pode mostrar sinergismo quando usada com antifúngicos, uma vez que já foi demonstrado sinergismo entre a anfotericina B e azitromicina contra *Fusarium* e *Aspergillus* (NGUYEN et al., 1997; CLANCY & NGUYEN, 1998).

A explicação para isso é de que azitromicina não tem atividade antifúngica inerente, devido a sua incapacidade de penetrar a membrana celular fúngica. Já a anfotericina B gera danos a membrana celular do fungo, permitindo a entrada da azitromicina para exercer seu efeito antimicrobiano, inibindo a síntese proteica (CLANCY & NGUYEN, 1998).

A combinação de azitromicina com antifúngicos é descrita ainda contra *Cryptococcus neoformans var. grubii*, *Pythium insidiosum*, e a azitromicina sozinha contra *Candida albicans* (KU; PALANISAMYA & LEE, 2010; JESUS et al., 2014; ROSSATO et al., 2015).

### **2.3.3 Dapsona**

A dapsona (4,4-diaminodifenilsulfona) é a molécula mais simples do grupo das sulfonas. Todos os fármacos desse grupo são derivados e compartilham características estruturais da dapsona (ZHU & STILLER, 2001). As sulfonas despertaram o interesse em virtude de sua relação química com as sulfonamidas e na

década de 1940, foi constatado que as sulfonas eram efetivas na supressão de infecções pelo bacilo da tuberculose, lepra e hanseníase (PETRI, 2010c).

A dapsona é a sulfona mais utilizada na clínica, agindo, provavelmente, por mecanismo semelhante ao das sulfonamidas, isto é, competindo com o ácido para-aminobenzóico na formação do ácido fólico (WOZEL, 2010; TAVARES, 2014).

Outra característica mostrada é que a dapsona sozinha (e através dos seus metabolitos) tem ação semelhante aos anti-inflamatórios não esteroides (AINES), especialmente em dermatologia, a qual é usada para o tratamento de certos distúrbios inflamatórios (por exemplo, erupções bolhosas auto-imunes) (WOZEL, 2010).

A dapsona sofre absorção rápida e quase completa pelo trato gastrointestinal, aproximadamente 70 % do fármaco ligam-se às proteínas plasmáticas, com sua meia vida de eliminação média entre 20 a 30 horas e cerca de 70-80% da dose é excretada na urina (PETRI, 2010c).

O fármaco distribui-se amplamente pelos líquidos e tecidos corporais e tende a ser retido na pele, músculo, fígado e rins. Dapsona é bem tolerada e seus efeitos colaterais mais comuns são anemia hemolítica, intolerância gastrointestinal, febre, prurido e erupções cutâneas (CHAMBERS, 2002c).

Tem ação antibacteriana contra estreptococos, estafilococos, bacilos gram-negativos, bacilo da tuberculose, mas não são indicadas para esses agentes devido à existência de drogas mais ativas e menos tóxicas (TAVARES, 2014).

A dapsona está indicada para o tratamento da hanseníase, pneumocistose (*Pneumocystis jiroveci*), além de já ter demonstrado efeito no tratamento da leishmaniose cutânea na Índia e para psoríase, sozinha ou em combinação com outros fármacos (TAVARES, 2014).

#### **2.3.4 Miltefosina**

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é um análogo fosfolipídico originalmente desenvolvido como um fármaco antitumoral, mas depois demonstrou ter potente atividade para tratamento da leishmaniose cutânea e visceral, ocasionando em seu licenciamento para tratamento em vários países (DORLO et al., 2012). Estudos subsequentes descobriram atividade inibitória relevante desse fármaco para *Trypanosoma cruzi* (LUNA et al., 2009). Além de propriedades antifúngicas com potencial para o desenvolvimento de terapias para infecções fúngicas invasivas (ZUO

et al., 2011). No Brasil, a miltefosina é o primeiro e único medicamento autorizado para o tratamento da Leishmaniose Visceral Canina (VIRBAC, 2018).

Tem boa biodisponibilidade oral (82–95%) em ratos e cães, respectivamente, distribui a todos os tecidos, acumulando-se principalmente no fígado, pulmões, rins e baço (DORLO et al., 2012), com concentrações no sangue alcançadas entre 4 e 48h após aplicação. A depuração plasmática do composto é baixa e a meia-vida de eliminação terminal é de 84h em ratos e 159h em cães (SINDERMANN & ENGEL, 2006). Pode apresentar efeitos de toxicidades como náuseas, vômitos, hepatotoxicidade bioquímica e erupções cutâneas (KESSON et al., 2009).

Segundo Zuo et al. (2011), o modo de ação da miltefosina nos fungos é pouco compreendido, pois, como é descrito pelo autor, para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a miltefosina é rapidamente incorporada na célula, onde penetra na membrana interna mitocondrial e altera o potencial de membrana, causando inibição dose-dependente do citocromo c oxidase (COX) e morte celular semelhante a apoptose.

Segundo Moreira et al. (2013), a miltefosina penetra na membrana plasmática através do seu componente lipídico e interage com as cadeias laterais hidrofóbicas na interface proteína lipídica. A partir dessa interação e da ação semelhante a detergente, a miltefosina causaria a ruptura da membrana fúngica.

Para Brilhante et al. (2015), a miltefosina pode alterar a permeabilidade da membrana celular fúngica, agindo na membrana nuclear e na redução da síntese do ergosterol. Mecanismo baseado na ruptura da membrana celular é consistente com o amplo espectro de ação relatado de miltefosina contra fungos patogênicos e protozoários, bem como alguns tipos de células tumorais (MOREIRA et al., 2013).

Borba-santos et al. (2015) demonstrou que miltefosina é ativa contra a forma leveduriforme de *Sporothrix brasiliensis*, a baixas concentrações ( $\leq 0,2 \mu\text{g/ml}$ ), induziu a instabilidade e perda da integridade da membrana plasmática e aumentou o teor de melanina nas células fúngicas.

Outros trabalhos demonstram a eficácia contra ambas as fases de desenvolvimento (formação e maturação) de biofilmes de *C. albicans* (CIM 1-2  $\mu\text{g/mL}$ ) e *F. oxysporum*, formados em fragmentos de unha humana *in vitro* (VILA; QUINTANILHA & ROZENTAL, 2015; VILA et al., 2015). Também demonstra que miltefosina inibe a formação de biofilme e atividade contra biofilmes pré-formados de

*C. albicans*, além de ter eficácia *in vivo* no tratamento tópico de candidíase orofaríngea em modelo com camundongos (VILA et al., 2015).

Outro trabalho mostra que miltefosina inibe o desenvolvimento *in vitro* dos fungos dimórficos *H. capsulatum* var. *capsulatum* (CIMs 0,25-2 µg/mL fase filamentosa e 0,125-1 µg/mL fase leveduriforme) e *Sporothrix* spp. (CIMs 0,25-2 µg/mL fase filamentosa) (BRILHANTE et al., 2014).

Ainda, a ação *in vitro* contra fungos é descrita para *Saccharomyces cerevisiae*, *Lomentospora* spp., mucormicetos e ainda contra o microrganismo *P. insidiosum* (ZUO et al., 2011; BISWAS et al., 2013; COMPAIN et al., 2015; LORETO et al., 2018).

Com relatos de sinergismo descritos entre miltefosina e fármacos como voriconazol e posaconazol (BISWAS et al., 2013; IMBERT et al., 2014).

Miltefosina também foi usada com sucesso em um paciente com osteomielite grave, infectado com *Lomentospora prolificans*, onde a terapia com terbinafina e voriconazol não respondiam adequadamente, e somente após a adição da miltefosina, a resolução gradual foi alcançada (KESSON et al., 2009).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Conidiobolus lamprauges* frente a agentes antifúngicos, antibacterianos e um antiprotozoário, isolados e associados.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *C. lamprauges* frente aos fármacos: 1) antifúngicos: anfotericina B, voriconazol, miconazol, terbinafina 2) antibacterianos: azitromicina, dapsona, cotrimoxazol e 3) antiprotozoário: miltefosina.

Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de isolados de *C. lamprauges* frente a associação de fármacos:

Azitromicina com: anfotericina B, voriconazol, miconazol, terbinafina, sulfametoxazol+trimetoprima, miltefosina, dapsona.

Sulfametoxazol+trimetoprima com: anfotericina B, voriconazol, miconazol, terbinafina, miltefosina.

Dapsona com: anfotericina B, voriconazol, miconazol, terbinafina, sulfametoxazol+trimetoprima, miltefosina.

Miltefosina com: anfotericina B, voriconazol, miconazol, terbinafina, sulfametoxazol+trimetoprima, azitromicina.

#### 4 MANUSCRITO

Title: *In vitro* assessment of antifungal, antibacterial and antiprotozoal drugs against clinical isolates of *Conidiobolus lamprauges*

Authors: Josias Stefanello<sup>1</sup>, Fernanda Barbisan<sup>3</sup>, Juliana S. M. Tondolo<sup>1</sup>, Erico S. Loreto<sup>3</sup>, Valéria Dutra<sup>2</sup>, Sydney H. Alves<sup>3</sup> and Janio M. Santurio<sup>1</sup>

Manuscrito submetido à revista Medical Mycology.

Title: ***In vitro* assessment of antifungal, antibacterial and antiprotozoal drugs against clinical isolates of *Conidiobolus lamprauges***

Short running title: *In vitro* assessment of antimicrobial drugs against *Conidiobolus lamprauges*

Authors: Josias Stefanello<sup>1</sup>, Fernanda Barbisan<sup>3</sup>, Juliana S. M. Tondolo<sup>1</sup>, Erico S. Loreto<sup>3</sup>, Valéria Dutra<sup>2</sup>, Sydney H. Alves<sup>3</sup>, Janio M. Santurio<sup>1</sup>

Affiliation:

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MG, Brazil

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil

#Address for correspondence:

Janio M. Santurio

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Av. Roraima nº 1000, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria - CEP 97105-900, RS, Brazil. Tel./fax: +55 55 3220-8906. E-mail: janio.santurio@gmail.com

## Abstract

We have determined *in vitro* activity of antifungal, antibacterial and antiprotozoal drugs alone and in combination against seven *Conidiobolus lamprauges* clinical isolates. The assays were based on the M38-A2 protocol and the checkerboard microdilution method. The most active drugs were amphotericin B, miconazole (MCZ), and terbinafine (MIC range 0.25-1; 2-8; 0.25-2 µg/mL, respectively), and miltefosine (MTF) (MIC range 2-16). The main synergism observed was through the combination of azithromycin (AZI)+MTF and dapsons (DAP)+MTF (100%), AZI+DAP (85.7%), AZI+MCZ (57.1%) as well as MCZ plus CTX and DAP (42.9%). *In vitro* activities suggest that the combination of MTF and AZI or DAP are promising candidate therapies for conidiobolomycosis.

Keywords: conidiobolomycosis, susceptibility testing, terbinafine, dapsons, miltefosine

## 1. Introduction

Conidiobolomycosis caused by *Conidiobolus* spp. is an uncommon fungal infection that can cause nasopharyngeal granulomas and subcutaneous infections in horses, mules, dogs, cats, sheep, nonhuman primates, and humans.<sup>1</sup> *Conidiobolus lamprauges* was described as the pathogenic agent of nasopharyngeal conidiobolomycosis affecting sheep,<sup>2</sup> horses<sup>3</sup> and in one case, disseminated human conidiobolomycosis.<sup>4</sup>

To date, there are no sufficient clinical or *in vitro* data to support a consensus about the optimal treatment of conidiobolomycosis and cases of therapeutic success and failure have been described in all forms of therapy, including surgical excision, antifungal therapy and saturated solutions of potassium iodide (SSKI).<sup>4-6</sup> Additionally, decreased susceptibility or resistance to most antimicrobial drugs *in vitro* are often reported.<sup>5,7-9</sup>

Therapies using nonantifungal drugs, such as sulfamethoxazole (SMX)/trimethoprim (TMP) in combination with antifungal drugs, SSKI, and hyperbaric O<sub>2</sub> therapy are described in cases when clinical improvement and complete recovery were observed<sup>5,10,11</sup> and also, in studies where no effect on the progress of the lesions was observed.<sup>12,13</sup> Interestingly, previous *in vitro* studies testing the antibacterial drug SMX/TMP showed a minimum inhibitory concentration (MIC) of 1 mg/L against *C. incongruus*<sup>13</sup> and 100% of synergistic interaction between SMX/TMP (MIC 4-8/8-32 µg/mL) against *C. lamprauges*.<sup>14</sup> In this context, this study aimed to explore *in vitro* susceptibility potential of SMX/TMP and other antibacterial drugs and the antiprotozoal miltefosine, as well as *in vitro* combination of these drugs with antifungals drugs against *C. lamprauges*.

## 2. Materials and methods

Seven Brazilian *C. lamprauges* isolates obtained from cases of sheep with granulomatous reactions in the nasopharyngeal region that were diagnosed with rhinoconidiobolomycosis were evaluated in this study. The *C. lamprauges* isolates had been previously identified by molecular phylogenetic analysis.<sup>15</sup>

Amphotericin B (AMB), miconazole (MCZ), voriconazole (VOR), terbinafine (TRB), azithromycin (AZI), miltefosine (MTF), sulfamethoxazole (SMX) and

trimethoprim (TMP) were purchased from Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, USA) as standard powers. Dapsone (DAP) was purchased from Fagron® (São Paulo, SP, Brazil). Cotrimoxazole (CTX) was prepared by the combination of SMX and TMP (ratio 5:1).

All drugs were diluted in dimethylsulfoxide or sterile distilled water to generate stock solutions. Moreover, broth microdilution susceptibility tests (BMDs) were performed following the CLSI M38-A2 protocol<sup>16</sup> as previously described by Tondolo et al.<sup>14</sup> The tests were performed in microdilution trays, and endpoints were determined as the MIC with 100% of growth inhibition.

The interactions between drugs were evaluated using a checkerboard test.<sup>17</sup> The lowest fractional inhibitory concentration index (FICI) was determined from the non-turbid wells along with the turbidity/non-turbidity growth interface after 48 h of incubation at 37°C and interpreted as follows: FICI ≤ 0.5, synergism; FICI > 0.5 to ≤ 4, indifference; FICI > 4, antagonism. All the plates were incubated at 37°C for 48 h, and then the interpretation of individual MICs (visual).

### 3. Results

The evaluation of MICs (in µg/mL) demonstrated the following MIC range (geometric mean [GM]): AMB, 0.25-1 (0.55); TRB, 0.25-2 (0.5), MCZ, 2-8 (4), VOR, 512; AZI, >64; CTX, 32/6.4-256/51.2 (78/15.6); DAP, >32; MTF, 2-16 (5.94). Table 1 summarizes *in vitro* synergistic interactions based on the MIC values between AZI, CTX, DAP, and MTF in combination with the antibacterial, antifungal, and antiprotozoal drugs. Synergistic interactions were observed when MTF was associated with AZI or DAP (100%), AZI+DAP (85.7%), and MCZ plus AZI or DAP (42.9%). The highest antagonistic interactions were observed from CTX+DAP and DAP+TRB (42.9%).

### 4. Discussion

AMB, TRB, and MCZ were considered the most effective drugs because they required the lowest concentrations for the *in vitro* inhibition of *C. lamprauges*. However, breakpoints have not been determined for mold susceptibility testing, and based on the breakpoint suggestions for other filamentous fungi in the M38-A2 protocol, it is

suggested that a predominance of resistance or reduced susceptibility to all antifungal drugs evaluated would be observed, with the exception of TRB.

Susceptibility tests for *C. lamprauges* were previously described in only a few reports<sup>4,8,9,14</sup> and their results are similar to those obtained in this study. Additionally, similar and discordant results can be observed in studies describing the susceptibility of *C. coronatus*<sup>5,7,8</sup> and *C. incongruus*.<sup>8,13,18</sup> In this context, *in vitro* testing of *Conidiobolus* species demonstrated that this genus shows multidrug resistance.<sup>5-7,12</sup>

This study represents the first assessment of *in vitro* activity of the antibacterial drugs AZI and DAP and the antiprotozoal MTF against *C. lamprauges*. AZI and DAP alone did not show an *in vitro* growth inhibition of *C. lamprauges*, but when MTF was combined with AZI or DAP 100% of synergism was observed with MICs four to five times lowest. MTF is used to treat visceral and cutaneous leishmaniasis<sup>19</sup>, however, antifungal activities have been described against various pathogenic fungi,<sup>20-22</sup> and *P. insidiosum*.<sup>23</sup> The mechanism of action is not fully understood but can be related to changes in cell membrane permeability and inhibition of ergosterol synthesis,<sup>24</sup> which may provide support for synergistic action.

## 5. Conclusion

In conclusion, *in vitro* data reported here suggest that MTF alone or associated with AZI and DAP deserve attention as candidates for the treatment of conidiobolomycosis infections. Additional *in vitro* and *in vivo* studies with a wide range of clinical isolates and different *Conidiobolus* spp. are needed to better understand the susceptibility to the antimicrobials described in this study.

## References

1. Samanta I. Cutaneous, subcutaneous and systemic mycology. In: Samanta I, ed. *Veterinary mycology*. 1st ed. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg; 2015:142-153.
2. Furlan FH, Luciola J, Veronezi LO, et al. Conidiobolomycosis caused by *Conidiobolus lamprauges* in sheep in the state of Santa Catarina, Brazil. *Pesq Vet Bras*. 2010;**30**: 529-532.
3. Humber RA, Brown CC, Kornegay RW. Equine zygomycosis caused by *Conidiobolus lamprauges*. *J Clin Microbiol*. 1989;**27**: 573-576.
4. Kimura M, Yaguchi T, Sutton DA, Fothergill AW, Thompson EH, Wickes BL. Disseminated human conidiobolomycosis due to *Conidiobolus lamprauges*. *J Clin Microbiol*. 2011;**49**: 752-756.
5. Bento DP, Tavares R, Martins Mda L, et al. Atypical presentation of entomophthoromycosis caused by *Conidiobolus coronatus*. *Med Mycol*. 2010;**48**: 1099-1104.
6. Choon SE, Kang J, Neafie RC, Ragsdale B, Klassen-Fischer M, Carlson JA. Conidiobolomycosis in a young Malaysian woman showing chronic localized fibrosing leukocytoclastic vasculitis: a case report and meta-analysis focusing on clinicopathologic and therapeutic correlations with outcome. *Am J Dermatopathol*. 2012;**34**: 511-522.
7. Fischer N, Rued C, Ebnother C, Bachli EB. Rhinofacial *Conidiobolus coronatus* infection presenting with nasal enlargement. *Infection*. 2008;**36**: 594-596.
8. Guarro J, Aguilar C, Pujol I. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Basidiobolus* and *Conidiobolus* spp. strains. *J Antimicrob Chemother*. 1999;**44**: 557-560.
9. Tondolo JS, de Loreto ES, Dutra V, et al. *In vitro* susceptibility of *Conidiobolus lamprauges* recovered from sheep to antifungal agents. *Vet Microbiol*. 2013;**166**: 690-693.
10. Oberdorfer P, Phloenchaiwanit P, Kongthavonsakul K, Chaiwun B. Subcutaneous entomophthoramycosis in a healthy 9-year-old boy. *Chiang Mai Medical Journal*. 2012;**51**: 125-129.
11. Yang X, Li Y, Zhou X, et al. Rhinofacial conidiobolomycosis caused by *Conidiobolus coronatus* in a Chinese rice farmer. *Mycoses*. 2010;**53**: 369-373.

12. Valle AC, Wanke B, Lazera MS, Monteiro PC, Viegas ML. Entomophthoramyces by *Conidiobolus coronatus*. Report of a case successfully treated with the combination of itraconazole and fluconazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2001;**43**: 233-236.
13. Wuppenhorst N, Lee MK, Rappold E, et al. Rhino-orbitocerebral zygomycosis caused by *Conidiobolus incongruus* in an immunocompromised patient in Germany. *J Clin Microbiol*. 2010;**48**: 4322-4325.
14. Tondolo JSM, Loreto ES, Jesus FPK, et al. In Vitro Assessment of Antifungal Drugs and Sulfamethoxazole-Trimethoprim against Clinical Isolates of *Conidiobolus lamprauges*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;**62**: e01685-01617.
15. de Paula DA, de Oliveira Filho JX, da Silva MC, et al. Molecular characterization of ovine zygomycosis in central western Brazil. *J Vet Diagn Invest*. 2010;**22**: 274-277.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. CLSI document M38-A2*. 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
17. Moody J. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. In: Garcia LS, Isenberg HD, eds. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press; 2007:1-23.
18. Temple ME, Brady MT, Koranyi KI, Nahata MC. Periorbital cellulitis secondary to *Conidiobolus incongruus*. *Pharmacotherapy*. 2001;**21**: 351-354.
19. Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother*. 2012;**67**: 2576-2597.
20. Imbert S, Palous M, Meyer I, et al. *In vitro* combination of voriconazole and miltefosine against clinically relevant molds. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;**58**: 6996-6998.
21. Widmer F, Wright LC, Obando D, et al. Hexadecylphosphocholine (miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;**50**: 414-421.
22. Brilhante RS, Malaquias AD, Caetano EP, et al. *In vitro* inhibitory effect of miltefosine against strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Sporothrix* spp. *Med Mycol*. 2014;**52**: 320-325.

23. Loreto ES, Tondolo JSM, Oliveira DC, Santurio JM, Alves SH. In Vitro Activities of Miltefosine and Antibacterial Agents from the Macrolide, Oxazolidinone, and Pleuromutilin Classes against *Pythium insidiosum* and *Pythium aphanidermatum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;**62**: e01678-01617.
24. Brilhante RS, Caetano EP, Lima RA, et al. *In vitro* antifungal activity of miltefosine and levamisole: their impact on ergosterol biosynthesis and cell permeability of dimorphic fungi. *J Appl Microbiol.* 2015;**119**: 962-969

Table 1. *In vitro* susceptibility of antibacterial, antiprotozoal and antifungal drugs alone and in combination against seven *Conidiobolus lamprauges* isolates<sup>b</sup>

Drugs alone		Combination (Drug 1 + Drug 2)	Drugs in combination					
Drug	MIC <sup>a</sup> (µg/mL) Range (GM)		MIC (µg/mL) Range (GM)		FICI			
			Drug(s) 1	Drug 2	FICI Range (GM)	Interpretation (%)		
					Syn	Ind	Ant	
Antibacterials		AZI + AMB	0.5-64 (1.20)	0.5-1 (0.82)	1.00-4.00 (1.58)	0	85.70	14.30
AZI	> 64	AZI + CTX	0.03-128 (0.99)	16/3.2-512/102.4 (128/25.6)	0.38-9.00 (1.95)	14.30	57.10	28.60
CTX	32/6.4-256/51.2 (78/15.6)	AZI + DAP	0.5-0.5 (0.5)	8-32 (11.31)	0.12-0.50 (0.18)	85.70	14.30	0
DAP	> 32	AZI + MCZ	0.5-128 (2.21)	0.25-64 (2.21)	0.25-9.00 (0.66)	57.10	28.60	14.30
		AZI + MTF	4-16 (7.25)	0.25-0.25 (0.25)	0.04-0.25 (0.10)	100	0	0
Antifungals		AZI + TRB	0.5-64 (8.00)	0.125-1 (0.37)	0.50-2.50 (1.17)	0	100	0
AMB	0.25-1.0 (0.55)	AZI + VOR	0.5-64 (9.19)	4-512 (40.32)	0.50-1.00 (0.63)	0	100	0
MCZ	2.0-8.0 (4.0)							
TRB	0.25-2.0 (0.50)	CTX + AMB	4/0.8-128/25.6 (47.6/9.52)	0.03-0.5 (0.05)	0.28-2.50 (0.91)	14.30	85.70	0
VOR	512 (512)	CTX + DAP	64/12.8-256/51.2 (128/25.6)	0.125-0.125 (0.125)	1.00-4.00 (1.64)	0	85.70	14.30
		CTX + MCZ	4/0.8-64/12.8 (29.0/5.8)	0.3-2.0 (0.70)	0.27-2.00 (0.73)	42.90	57.10	0
Antiprotozoal		CTX + MLT	4/0.8-64/12.8 (12.0/2.4)	0.25-8.0 (1.81)	0.14-1.13 (0.73)	14.30	85.70	0
MTF	2-16 (5.94)	CTX + TRB	4/0.8-256/51.2 (58/11.6)	0.03-0.25 (0.05)	0.19-8.50 (0.94)	14.30	71.40	14.30
		CTX + VOR	4/0.8-4/0.8 (4/0.8)	256-512 (362)	0.56-1.13 (0.77)	14.30	85.70	0
		DAP + AMB	0.125-8 (0.37)	0.03-2 (0.67)	0.16-4.00 (1.54)	14.30	42.85	42.85
		DAP + MCZ	0.125-32 (0.45)	2-4 (2.44)	0.50-4.50 (1.12)	42.90	57.10	0
		DAP + MLT	2-8 (5.66)	0.25-0.25 (0.25)	0.06-0.25 (0.14)	100	0	0
		DAP + TRB	0.25-32 (1.0)	0.50-4 (1.22)	0.50-8.50 (2.49)	0	57.10	42.90
		DAP + VOR	0.25-32 (0.66)	256-512 (456.14)	0.50-1.50 (0.95)	0	100	0
		MTF + AMB	8-32 (10.8)	0.03-0.06 (0.04)	0.53-4.12 (1.89)	0	71.40	28.60
		MTF + MCZ	0.25-16 (3.28)	0.25-8 (0.74)	0.53-4.13 (1.33)	0	85.70	14.30
		MTF + TRB	8-16 (10.08)	0.03-0.03 (0.03)	0.56-4.12 (1.89)	0	85.70	14.30
		MTF + VOR	0.25-8 (0.66)	64-512 (256)	0.53-1.12 (0.73)	0	100	0

<sup>a</sup>MIC (100% growth inhibition)<sup>b</sup>Abbreviations: MIC, minimum inhibitory concentration; GM, geometric mean; FICI, fractional inhibitory concentration index; Syn, synergism; Ind, indifference; Ant, antagonism; AMB, amphotericin B; AZI, azithromycin; CTX, cotrimoxazole (sulfamethoxazole / trimethoprim at ratio 5:1); DAP, dapsone; MCZ, miconazole; MTF, miltefosine; TRB, terbinafine; VOR, voriconazole.

## 5 CONCLUSÃO

A avaliação da suscetibilidade de *C. lamprauges* frente a fármacos antifúngicos, antibacterianos e antiprotozoário, isolados e combinados permitiu concluir que:

- Terbinafina inibiu os isolados testados, apresentando CIM variando de 0,25 µg/mL a 2 µg/mL.

- Os isolados de *C. lamprauges* foram consideradas resistentes ou pouco suscetíveis à anfotericina B, voriconazol, miconazol, aos fármacos antibacterianos cotrimoxazol, azitromicina, dapsona e ao antiprotozoário miltefosina.

- O presente estudo foi o primeiro a avaliar a atividade *in vitro* dos fármacos antibacterianos AZI e DAP e o antiprotozoário MTF, contra *C. lamprauges*.

- As combinações de miltefosina/azitromicina e miltefosina/dapsona apresentaram 100% de sinergismo e a combinação de azitromicina/dapsona apresentou 85,7% de sinergismo.

- As combinações de dapsona/anfotericina B e dapsona/terbinafina apresentaram os maiores índices de antagonismo, 42,9%.

- As combinações com maiores índices de sinergismo merecem atenção, sendo necessários estudos adicionais *in vitro* e *in vivo* com uma ampla gama de isolados clínicos e diferentes *Conidiobolus spp.* para uma avaliação mais profunda da suscetibilidade aos antimicrobianos descritos neste estudo.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. M. N. Epidemiological aspects of conidiobolomycosis in sheep in the Northeastern Brazilian semiarid region. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 12, p. 2210-2216, dez. 2014.
- ARORA, N.; BHARGAVA, E. K.; RAI, V. R. Nasal conidiobolomycosis – the unknown threat. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 10, n. 12, Dec. 2016.
- BAUER, R. W. et al. Oral conidiobolomycosis in a dog. **Veterinary dermatology**. v. 8, p. 115-120, 1997.
- BENTO, D. P. et al. Atypical presentation of entomophthoromycosis caused by *Conidiobolus coronatus*. **Medical Mycology**, v. 48, p. 1099-1104, Dec. 2010.
- BENNETT, J. E. Agentes antimicrobianos: agentes antifúngicos. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Porto Alegre, RS. AMGH, 2010. cap. 48, p. 1103-1118.
- BISWAS, C. et al. *In vitro* activity of miltefosine as a single agent and in combination with voriconazole or posaconazole against uncommon filamentous fungal pathogens. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 68, p. 2842-2846, July. 2013.
- BOABAID, F. M. et al. Conidiobolomicose em ovinos no estado de Mato Grosso. **Pesquisa veterinária brasileira**, v. 28, p.77-81, Jan. 2008.
- BORBA-SANTOS, L. P. et al. Miltefosine is active against *Sporothrix brasiliensis* isolates with in vitro low susceptibility to amphotericin B or itraconazole. **Journal of medical microbiology**. v. 64, p. 415-422, 2015.
- BORGES, S. R. C. et al. Itraconazole vs. trimethoprim–sulfamethoxazole: A comparative cohort study of 200 patients with paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**. v. 52, p. 303-310, Jan. 2014.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. In vitro inhibitory effect of miltefosine against strains of *Histoplasma capsulatum var. capsulatum* and *Sporothrix spp*. **Medical Mycology**. v. 52, p. 320-325, Mar. 2014.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. In vitro antifungal activity of miltefosine and levamisole: their impact on ergosterol biosynthesis and cell permeability of dimorphic fungi. **Journal of applied microbiology**. v. 119, p. 962-969, Jun. 2015.
- BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C. Bacteriologia. In: BROOKS, G. F. et al., **Microbiologia Médica**. 25 ed. Porto Alegre, RS. AMGH, 2012. cap. 28, p. 339-372
- CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 23, p. 39-49, 2006.

CHAMBERS, H. F. sulfonamidas, trimetoprima & quinolonas. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica & clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan, 2002. cap. 46. p. 691-698.

CHAMBERS, H. F. Cloranfenicol, Tetraciclinas, Macrolídios, Clindamicina & Estreptograminas. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica & clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan, 2002b. cap. 44. p. 674-682.

CHAMBERS, H. F. Agentes antimicobacterianos. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica & clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan, 2002c. cap. 47. p. 699-708.

CHOON, S. et al. Conidiobolomycosis in a young Malaysian woman showing chronic localized fibrosing leukocytoclastic vasculitis: a case report and meta-analysis focusing on clinicopathologic and therapeutic correlations with outcome. **The American Journal of Dermatopathology**. v. 34, n. 5, p. 511-522, Jul. 2012.

CHOWDHARY, A. et al. Rhinoentomophthoromycosis due to *Conidiobolus coronatus*. A case report and an overview of the disease in India. **Medical Mycology**, v. 48, p. 870-879, Sept. 2010.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. The combination of amphotericin B and azithromycin as a potential new therapeutic approach to fusariosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 41, p. 127–130, 1998.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: Approved Standard**, 2 ed. CLSI, Wayne, PA. M38-A2, 2008. 35 p.

COMPAIN, F. et al. In vitro activity of miltefosine in combination with voriconazole or amphotericin B against clinical isolates of *Scedosporium spp.* **Journal of medical microbiology**. v. 64, n. 3, p. 309-311, Mar. 2015.

COSTA, E. O. da.; GORDIAK, S. L. Agentes antifúngicos e antivirais. In: SPINOSA, H. de S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARD, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan. 2011. cap. 41, p. 474-486.

CREEMERS-SCHILD, D. et al. Treatment of Pneumocystis pneumonia with intermediate-dose and step-down to low-dose trimethoprim–sulfamethoxazole: lessons from an observational cohort study. **Infection**. v. 44, p. 291-299, Oct. 2016.

CRUZ, L. C. H. da. **Micologia veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro, RJ. Revinter, 2010. 348 p.

DE PAULA, D. A. J. et al. Molecular characterization of ovine zygomycosis in central western Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 2, p. 274-277, 2010.

DOLTON, M. J. et al. Understanding variability with voriconazole using a population pharmacokinetic approach: implications for optimal dosing. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 69, p. 1633-1641, 2014.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal Antimicrob Chemother**. v. 67, p. 2576-2597, July. 2012.

DÜRRBECK, A.; NENOFF, P. Terbinafin. Relevante arzneimittelinteraktionen und deren management. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**. v. 67, p. 718-723, Juli. 2016.

EVANS, D. E. et al. Entomophthoromycosis and mucormycosis as causes of pneumonia in Vietnamese potbellied pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 30, p. 161-164. 2018.

FISCHER, N. et al. Rhinofacial *Conidiobolus coronatus* infection presenting with nasal enlargement. **Infection**, v. 36, p. 594-596, Nov. 2008.

FRENCAHN, R. A.; ASHWOR, C. D. Zygomycosis Caused by *Conidiobolus coronatus* in a Llama (*Lama glama*). **Veterinary pathology**, v. 31, p.120-122, 1994.

FURLAN, F. H. et al. Conidiobolomycose causada por *Conidiobolus lamprauges* em ovinos no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa veterinária brasileira**, v.30, p.529-532, Jul. 2010.

GUARRO, J. et al. In- vitro antifungal susceptibilities of *Basidiobolus* and *Conidiobolus* spp. strains. **Journal of antimicrobial chemotherapy**. v. 44, p. 557-560, 1999.

GORDIAK, S. L. Sulfas, Quinolonas e outros quimioterápicos. In: SPINOSA, H. de S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARD, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan, 2011. cap. 36, p. 432-449.

GUGNANI, H. C. Entomophthoromycosis due to conidiobolus. **European journal of epidemiology**. v. 8, n. 3, p. 391-396, May. 1992.

HANAFY, A. et al. In vitro antifungal activities of sulfa drugs against clinical isolates of *Aspergillus* and *Cryptococcus* species. **Journal Medical Mycology**. v. 48, p. 47-50, 2007.

HANDA, A. et al. Nasofacial zygomycosis by *Conidiobolus coronatus* responsive to itraconazole. **American journal of rhinology & allergy**, Índia, p. 157-159, Feb. 2000.

HAWKINS, E. C. et al. Treatment of *Conidiobolus* sp. pneumonia with Itraconazole in a dog receiving immunosuppressive therapy. **Journal of veterinary internal medicine**. v. 20, p. 1479-1482, Jun. 2006.

HOPKINS, S. Clinical Toleration and Safety of Azithromycin. **The American Journal of Medicine**. v. 91, n. 3<sup>a</sup>, p. 40-45, Sept.1991.

HUMBER, R. A. et al. Equine zygomycosis caused by *Conidiobolus lamprauges*. **Journal of clinical microbiology**, Louisiana, v. 27, n. 3, p. 573-576, Mar. 1989.

HUMBER, R. A. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. **Mycotaxon**, v. 120, n. 1, p. 477-492, 2012.

IMBERT, S. et al. In Vitro Combination of Voriconazole and Miltefosine against clinically relevant molds. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 58, n. 11, p. 6996–6998, Nov. 2014.

ISA-ISA, R. et al. Rhinofacial conidiobolomycosis (entomophthoramycosis). **Clinics in Dermatology**, v. 30, p. 409-412, 2012.

JESUS, F. P. K. et al. *In vitro* synergism observed with azithromycin, clarithromycin, minocycline, or tigecycline in association with antifungal agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 58, n. 9, p. 5621-5625, Sept. 2014.

JUDD, W. R.; MARTIN, C. A. Antifungal activity of nontraditional antifungal agents. **Fungal infection reports**. v. 3, p. 86-95, 2009.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms And clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 120-128, Jan. 2008.

KESSON, A. L. et al. *Scedosporium prolificans* Osteomyelitis in na Immunocompetent Child Treated with a Novel Agent, Hexadecylphosphocholine (Miltefosine), in Combination with Terbinafine and Voriconazole: A Case Report. **Clinical infectious diseases**. v. 48, p. 1257-1261, Mar. 2009.

KIMURA, M. et al. Disseminated human conidiobolomycosis due to *Conidiobolus lamprauges*. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 2, p. 752-756, Feb. 2011.

KU, T. S. N.; PALANISAMYA, S. K. A.; LEE, B. S. A. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to azithromycin, tigecycline and vancomycin and the interaction between tigecycline and antifungals. **International journal of antimicrobial agents**. v. 36, p. 441–446, 2010.

KWON-CHUNG, K. J. Taxonomy of fungi causing Mucormycosis and Entomophthoramycosis (Zygomycosis) and nomenclature of the disease: molecular mycologic Perspectives. **Clinical infectious diseases**, Bethesda, v. 54, p. 8-15, 2012.

KYDER, N. S. Terbinafine: Mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. **British journal of dermatology**. v. 126, n. 39, p. 2-7, 1992.

LACAZ, C. Da S. et al. Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. Provas de sensibilidade in vitro. Dosagem sanguínea. In: \_\_\_\_\_. **Tratado de micologia médica Lacaz**. São Paulo, SP. Sarvier, 2002. cap. 41, p. 998-1096.

LODE, H. The Pharmacokinetics of Azithromycin and their clinical significance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 10, n. 10, p. 807-812, Oct. 1991.

LORETO, E. S. et al. In vitro activities of miltefosine and antibacterial agents from macrolide, oxazolidinone, and pleuromutilin classes against *Pythium insidiosum* and *Pythium aphanidermatum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. Jan. 2018.

LUNA, K. P. et al. *In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. **Biomédica**. v. 29, p. 448-455, 2009.

MACKEY, P. E. et al. Disseminated *Conidiobolus incongruus* in adog: A case report and literature review. **Medical mycology case reports**, Elsevier, v. 8, p. 24-28, Feb. 2015.

MITCHELL, T. G. Micologia. In: BROOKS, G. F. et al., **Microbiologia Médica**. 25 ed. Porto Alegre, RS. AMGH, 2012. cap. 45, p. 625-664.

MOODY, J. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. In: GARCIA, L. S.; ISENBERG, H. D. eds. **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. 2 ed. Washington, DC: ASM Press, 2007, p. 1-23. MOODY, 2007.

MOREIRA, R. A. et al. Interaction of Miltefosine with the lipid and protein components of the erythrocyte membrane. **Journal of pharmaceutical sciences**. v. 102, n. 5, p. 1661-1669, May. 2013.

MORRIS, M. et al. Rhinocerebral zygomycosis in a sheep. **The Canadian Veterinary Journal**, Saskatchewan, v. 42, p. 227–228, Mar. 2001.

NGUYEN, M. H. et al. Potentiation of antifungal activity of Amphotericin B by Azithromycin against *Aspergillus* Species. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**. v. 16, p. 846-848, 1997.

PEDROSO, P. M. O. et al. Rinite micótica rinofaríngea em um ovino Texel no Rio Grande do Sul. **Acta scientiae veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, p. 181-185, 2009.

PETRI, W. A. J. Sulfonamidas, sulfametoxazol-trimetoprima, quinolonas e agentes para infecção do trato urinário. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Porto Alegre, RS. AMGH, 2010a. cap. 43, p. 999-1012.

PETRI, W. A. J. Inibidores da síntese de proteínas e agentes antibacterianos diversos. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Porto Alegre, RS. AMGH, 2010b. cap. 46, p. 1055-1082.

PETRI, W. A. J. Quimioterapia da tuberculose, complexo *Mycobacterium avium* e hanseníase. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman:**

**as bases farmacológicas da terapêutica.** 11 ed. Porto Alegre, RS. AMGH, 2010c. cap. 47, p. 1083-1102.

PATTERSON, T. F. Treatment of invasive aspergillosis: Polyenes, echinocandins, or azoles?. **Medical Mycology.** v. 44, p. 357-362, Sept. 2006.

PIERCE, C. G. et al. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **National Institutes of Health.** v. 3, n. 9, Sep. 2010.

PORTELA, R. A. et al. Doenças da cavidade nasal em ruminantes no Brasil. **Pesquisa veterinária brasileira,** v. 30, p. 844-854, out. 2010.

ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Drogas antifúngicas utilizadas na terapêutica contemporânea. In: \_\_\_\_\_. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos.** Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan, 2004. cap. 6, p. 50-62.

RADOSTITS, O. M. et al. Diseases associated with algae and fungi. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary Medicine a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats.** 10 ed. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2009. cap. 25, p. 1471-1482.

RIET-CORREA, F. et al. Outbreaks of rhinofacial and rhinopharyngeal zygomycosis in sheep in Paraíba, northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 28, n. 1, p. 29-35, Jan. 2008.

ROSSATO, L. et al. In vitro interaction of antifungal and antibacterial drugs against *Cryptococcus neoformans var. grubii* before and after capsular induction. **Medical Mycology.** v. 53, p. 885-889, 2015.

SHEPPARD, D.; LAMPIRIS, H. W. Agentes Antifúngicos. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica & clínica.** 8 ed. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan, 2002. cap. 48, p. 709-716.

SINDERMANN, H.; ENGEL, J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. **Royal society of tropical medicine and hygiene.** v. 100, p. 17-20, May. 2006.

SILVA, S. M. M. S. et al. Conidiobolomycosis in sheep: reevaluation of three cases previously diagnosed as enzootic ethmoid tumor. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia,** Belo Horizonte, v. 62, n.6, p.1503-1506, Dez. 2010.

SILVA, S. M. M. et al. Conidiobolomycosis in sheep in Brazil. **Veterinary Pathology.** v.44, p.314-319, 2007a.

SILVA, S. M. M. et al. Epidemiologia e sinais clínicos da conidiobolomicose em ovinos no estado do Piauí. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 27, n. 4, p. 184-190, Abr. 2007b.

SILVEIRA, M. M. et al. Development and application of polymerase chain reaction test for detection of *Conidiobolus lamprauges*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 33, n. 12, p. 1448-1452, Dez. 2013.

SPINOSA, H. de S. Antibióticos bacteriostáticos, que interferem na síntese proteica: Macrolídios, Lincosamidas, Pleuromutilinas, Streptograminas, Tetraciclina, Cloranfenicol e derivados. In: SPINOSA, H. de S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARD, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan, 2011. cap. 40, p. 464-473.

SRINIVASAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; RAMASUBRAMANIAN, A. K.; Overcoming antifungal resistance. **National Institutes of Health**. v. 11, p. 1-11, Mar. 2014.

STEIGER, R. R.; WILLIAMS, M. R. Granulomatous tracheitis caused by *Conidiobolus coronatus* in a horse. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 14, p. 311-314, Jan. 2000.

TADANO, T. et al. Entomophthoromycosis (zygomycosis) caused by *Conidiobolus coronatus* in Mato Grosso (Brazil): case report. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**. v. 38, n.2, p. 188-190, mar-abr, 2005.

TAINTOR, J. et al. Treatment of Conidiobolomycosis with Fluconazole in two pregnant mares. **Journal of veterinary internal medicine**. v. 18, p. 363-364, 2004.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 3 ed. São Paulo, SP. Editora Atheneu, 2014. 746 p.

TEMPLE, M. E. et al. Periorbital cellulitis secondary to *Conidiobolus incongruus*. **Pharmacotherapy**. v. 21, n. 3, 2001.

THOMAS, M. M. et al. Rhinoentomophthoromycosis. **Indian journal of dermatology venereology and leprology**, Índia, v. 72, ed. 4, p. 296-299, 2006.

THOMPSON, K. Bones and joints. Fungal diseases of skin. In: \_\_\_\_\_ **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**, 5 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007. cap. 5, p. 729-743.

TONDOLO, J. S. M. et al. *In vitro* assessment of antifungal drugs and sulfamethoxazole-trimethoprim against clinical isolates of *Conidiobolus lamprauges*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 62, p. 1-4, Apr. 2018.

TONDOLO, J. S. M. et al. In vitro susceptibility of *Conidiobolus lamprauges* recovered from sheep to antifungal agents. **Veterinary Microbiology**. v. 166, p. 690-693, July 2013.

UBIALI, D. G. et al. Pathology of nasal infection caused by *Conidiobolus lamprauges* and *Pythium insidiosum* in sheep. **J. Comp. Path.** V. 149, p. 137-145, 2013.

VILA, T. V. M.; QUINTANILHA, N. S.; ROZENTAL, S. Miltefosine is effective against *Candida albicans* and *Fusarium oxysporum* nail biofilms in vitro. **Journal of medical microbiology**. v. 64, p. 1436-1449, 2015.

VILA, T. V. M. et al. In vitro activity of miltefosine against *Candida albicans* under planktonic and biofilm growth conditions and in vivo efficacy in a murine model of oral candidiasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 59, n. 12, p. 7611-7620, Dec. 2015.

VILELA, R. et al. Morphologic and phylogenetic characterization of *Conidiobolus lamprauges* recovered from infected sheep. **Journal of clinical microbiology**. v. 48, n. 2, p. 427–432, Feb. 2010.

VIRBAC. Milteforam™ perguntas e respostas mais frequentes. **Virbac Shaping the future of animal health**. Disponível em: [https://br.virbac.com/files/live/sites/br-public/files/contributed/PDFs/AF\\_FAQ\\_DIGITAL.pdf](https://br.virbac.com/files/live/sites/br-public/files/contributed/PDFs/AF_FAQ_DIGITAL.pdf). Acesso em: Mai. 2018.

WALKER, S. D. et al. Fatal disseminated *Conidiobolus coronatus* infection in a renal transplant patient. **Clinical microbiology and infectious diseases**. v. 98, n. 6, p. 559-564, Dec. 1992.

WEIBLEN, C. et al. Epidemiological, clinical and diagnostic aspects of sheep conidiobolomycosis in Brazil. **Ciência Rura**. v.46, n. 5, p. 839-846, Mai. 2016.

WOZEL, V. E. G. Innovative use of Dapsone. **Dermatologic Clinics**. v. 28, p. 599-610, 2010.

WÜPPENHORST, N. et al. Rhino-orbitocerebral zygomycosis caused by *Conidiobolus incongruus* in an immunocompromised patient in Germany. **Journal of clinical microbiology**, Freiburg, v. 48, n. 11, p. 4322–4325, Sept. 2010.

ZHANG, et al. Efficacy of caspofungin combined with trimethoprim/sulfamethoxazole as first-line therapy to treat non-HIV patients with severe pneumocystis pneumonia. **Experimental and therapeutic medicine**. v. 15, p. 1594-1601, 2018.

ZHU, Y. I.; STILLER, M. J. Dapsone and sulfones in dermatology: Overview and update. **American academy of dermatology**. v. 45, n. 3, p. 420-434, 2001.

ZUO, X. et al. Miltefosine induces apoptosis-like cell death in yeast via Cox9p in Cytochrome c Oxidase. **Molecular pharmacology**. v. 80, p. 476–485, Mar. 2011.