

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

**ASPECTOS FENOTÍPICOS E PERFIL DE
SUSCETIBILIDADE DE *C. dubliniensis* RESISTENTES
AO FLUCONAZOL FRENTE A ANTIFÚNGICOS E
ASSOCIAÇÕES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Liliane Alves Scheid

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**ASPECTOS FENOTÍPICOS E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE
DE *C. dubliniensis* AO FLUCONAZOL FRENTE A
ANTIFÚNGICOS E ASSOCIAÇÕES**

por

Liliane Alves Scheid

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle da Qualidade e Avaliação Biofarmacêutica de Insumos e Medicamentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientador: Sydney Hartz Alves

Santa Maria, RS, Brasil

2007

© 2007

Todos os direitos autorais reservados a Liliane Alves Scheid. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito da autora.

Endereço eletrônico: l.scheid@hotmail.com

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

ASPECTOS FENOTÍPICOS E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE *C. dubliniensis* RESISTENTES AO FLUCONAZOL FRENTE A ANTIFÚNGICOS E ASSOCIAÇÕES

elaborada por
Liliane Alves Scheid

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sydney Hartz Alves, Dr.
(Presidente/Orientador)

Marilise Escobar Burguer, Dr^a (UFSM)

Jânio Morais Santúrio, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 23 de novembro de 2007.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Nestor e Elizabeth Scheid

Por seu amor, carinho e apoio,
compartilho esta conquista com vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Nestor e Elizabeth, pelo amor, carinho, paciência e compreensão diante de tantas horas de ausência, e por simplesmente estarem ao meu lado nas escolhas mais importantes da minha vida. Serei eternamente grata a vocês.

À minha irmã, Patrícia, pela amizade e incentivo nesta caminhada, pelos exemplos de perseverança e pela presença contínua em minha vida.

Ao meu noivo, Guilherme, por todo seu amor, apoio e respeito por minha dedicação a este trabalho. Agradeço por me não me deixar desanimar nos momentos mais difíceis, por acreditar na minha capacidade, e por me incentivar a continuar sempre. Por esses e outros motivos, esta conquista também te pertence, meu amor.

Ao meu orientador, Prof. Sydney Hartz Alves, pela acolhida desde 2002 quando me aceitou como sua aluna de iniciação científica, pela paciência e confiança em meu trabalho. Agradeço pela amizade e carinho demonstrados, pelos ensinamentos e oportunidades que me foram oferecidas, e pela paixão pela pesquisa que me despertou. Muito Obrigada.

A todos os colegas de LAPEMI, pelos momentos de apoio, amizade e descontração, que certamente contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial, agradeço a minha “eterna” bolsista, Débora, por seu empenho, responsabilidade e disposição para acompanhar meus estudos e viabilizar a conclusão deste trabalho.

Ao Professor Jânio M. Santúrio, pela acolhida, pela amizade, ensinamentos, e apoio laboratorial disponibilizado para o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Clarice Rolim, em nome de todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela disponibilidade e carinho prestados e por todo o conhecimento que me foi transmitido.

À CAPES, pelo apoio financeiro fornecido através de bolsa de estudos.

Às minhas queridas amigas, Aline, Maísa e Patrícia, pelo companheirismo, amizade e carinho constantes, pelos momentos difíceis que me ajudaram a sustentar e pelos ótimos momentos pudemos compartilhar nesses anos. Muito obrigada!

*“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis”.*

(Fernando Pessoa)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

COMPORTAMENTO FENOTÍPICO E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE *C. dubliniensis* RESISTENTES AO FLUCONAZOL FRENTE A ANTIFÚNGICOS E ASSOCIAÇÕES

Autora: Liliane Alves Scheid

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 23 de novembro de 2007.

O uso prolongado e indiscriminado dos azólicos nos últimos anos permitiu um rápido desenvolvimento de resistência aos fármacos nas espécies de *Candida*. Em *Candida albicans*, a resistência ao fluconazol causa resistência cruzada a outros antifúngicos e aumento na virulência, tornando o tratamento ainda mais complicado por causa das opções terapêuticas limitadas. Ainda assim, outras espécies emergiram como patógenos significantes de importância clínica. A resistência ao fluconazol tem sido clinicamente descrita em isolados de *Candida dubliniensis* e é facilmente induzida pela exposição *in vitro* ao azólico, mas pouco se conhece sobre suas conseqüências.

No presente estudo, dois grupos de isolados de *C. dubliniensis* foram avaliados e comparados em alguns aspectos com *C. albicans*. Um grupo era composto de isolados clínicos sensíveis ao fluconazol, e o outro, derivado do primeiro, era composto de isolados resistentes, com o intuito de analisar as alterações nas características fenotípicas e na suscetibilidade aos antifúngicos que acompanham o desenvolvimento de resistência ao fluconazol. Os derivados resistentes obtidos evidenciaram concentrações inibitórias mínimas maiores ou iguais a 64 µg/mL e mantiveram grande parte das características fenotípicas avaliadas anteriormente à indução da resistência. Entretanto, apenas o Ágar Suco de Tomate permitiu a identificação dessas estruturas em 100% dos isolados resistentes. Diante das toxinas “killer”, *C. albicans* e *C. dubliniensis* exibiram biotipos incapazes de permitir a diferenciação entre as espécies. Por outro lado, quando avaliada a atividade de proteinase, a de *Candida albicans* foi significativamente maior do que a de *C. dubliniensis*.

Os derivados resistentes de *C. dubliniensis* evidenciaram atividade de proteinase semelhante a dos isolados sensíveis ao fluconazol, sugerindo que a resistência ao antifúngico pode não necessariamente acarretar aumento de virulência na espécie. Microaerofilia, fluconazol a concentrações subinibitórias, ou a combinação dessas duas condições, bem como a adição de anti-retrovirais ao meio de indução da enzima não exerceram influência sobre a atividade de proteinase em *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

C. dubliniensis resistentes ao fluconazol evidenciaram resistência cruzada com cetoconazol, itraconazol, ravuconazol e terbinafina. Em adição, as associações de anfotericina B ou terbinafina com azólicos resultaram principalmente em interações indiferentes. Em isolados sensíveis, a interação mais positiva resultou da associação de anfotericina B com voriconazol. Quando a resistência foi induzida, a melhor atividade foi encontrada quando a terbinafina foi combinada com itraconazol.

Palavras-chaves: *Candida dubliniensis*, resistência, fluconazol, antifúngicos.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

COMPORTAMENTO FENOTÍPICO E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE *C. dubliniensis* RESISTENTES AO FLUCONAZOL FRENTE A ANTIFÚNGICOS E ASSOCIAÇÕES

Autora: Liliane Alves Scheid

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 23 de novembro de 2007.

Widespread and prolonged usage of azoles in recent years has led to the rapid development of drug resistance in *Candida* species. In *Candida albicans*, resistance to fluconazole causes cross-resistance to other antifungals and an increase in virulence, making treatment still more difficult because of the limited therapeutical options. Nonetheless, other species has emerged as significant pathogens of clinical importance. Fluconazole resistance has been clinically described in *Candida dubliniensis* isolates and it is easily induced by *in vitro* exposure to the drug, but little is known about its consequences.

In the present study, two groups of *C. dubliniensis* isolates were evaluated and compared in some points with the closely related species, *C. albicans*. One group was composed by fluconazole-susceptible clinical isolates and the other was composed by fluconazole-resistant laboratory derivatives from the former, in order to examine the changes on phenotypic characteristics and antifungal susceptibility accompanying the development of resistance to fluconazole. Resistant derivatives showed minimal inhibitory concentrations equal or higher than 64 µg/mL and proved to keep most of phenotypic characteristics that were tested before resistance was induced. However, some strains were not found to produce pseudomycelia and chlamydo spores.

Against “killer” toxins, *C. dubliniensis* did not present biotypes enough to permit its differentiation from *C. albicans*. On the other hand, when proteinase activity was evaluated, *C. albicans* activity was significantly higher than *C. dubliniensis*.

Resistant derivatives of *C. dubliniensis* showed proteinase activity similar to fluconazole-susceptible isolates, suggesting that fluconazole resistance may not necessarily result on an increase of virulence in this species. Partial atmosphere of CO₂, fluconazole at subinhibitory concentrations, or combination of both conditions, as well as addition of anti-retrovirals on induction culture medium did not influence on proteinase activity of *C. albicans* and *C. dubliniensis* isolates.

Finally, fluconazole-resistant isolates showed cross-resistance with ketoconazole, itraconazole, ravuconazole and terbinafine. In addition, associations of amphotericin B or terbinafine with azoles resulted mainly on indifferent interactions. On fluconazole-susceptible isolates, the most positive interaction came from association of amphotericin B with voriconazole. When resistance was induced, the best activity was found when terbinafine was combined with itraconazole.

Keywords: *Candida dubliniensis*, resistance, fluconazole, antifungals

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1: Cepas padrões produtoras de toxinas “killer” utilizadas no ensaio.....	40
Quadro 2: Composição dos dígitos para a determinação dos biotipos “killer”, segundo POLONELLI et al (1983).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) <i>in vitro</i> dos isolados de <i>C. dubliniensis</i> frente ao fluconazol antes (FS) e após (FR) os 15 dias de crescente exposição ao azólico.	48
Tabela 2: Comparação das características fenotípicas de <i>C. dubliniensis</i> sensíveis (FS) e resistentes (FR) ao fluconazol.	49
Tabela 3: Comparação das atividades de proteinase (em unidades de absorvância) de <i>C. albicans</i> (FS) e <i>C. dubliniensis</i> (FS e FR) sob diferentes condições de incubação.....	50
Tabela 4: Biotipos de suscetibilidade dos isolados de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> frente às toxinas “killer”	51
Tabela 5: Percentuais de suscetibilidade dos isolados de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> às toxinas “killer” produzidas por 9 cepas padrões.	51
Tabela 6: Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) <i>in vitro</i> dos isolados de <i>C. dubliniensis</i> aos agentes antifúngicos antes (FS) e depois (FR) dos 15 dias de crescente exposição ao fluconazol.	52
Tabela 7: Interações das combinações de antifúngicos <i>in vitro</i> frente a <i>C. dubliniensis</i> sensíveis (FS) e resistentes (FR) ao fluconazol, utilizando a técnica de “checkerboard”	54
Tabela 8: Percentuais de sinergismo, aditividade, indiferença e antagonismo resultantes das combinações de terbinafina, anfotericina B, itraconazol e voriconazol frente a <i>Candida dubliniensis</i> sensíveis (FS) e resistentes (FR) ao fluconazol.....	54

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Características fenotípicas de <i>C. dubliniensis</i> sensíveis ao fluconazol.	83
APÊNDICE B - Características fenotípicas de <i>C. dubliniensis</i> resistentes ao fluconazol.	84
APÊNDICE C - Atividades de proteinase (em unidades de absorvância) de <i>Candida albicans</i> (sensíveis ao fluconazol) sob microaerofilia (I), concentrações subinibitórias de fluconazol (II) e combinação das duas condições (III).	85
APÊNDICE D - Atividade de proteinase dos isolados de <i>Candida albicans</i> frente aos anti-retrovirais inibidores de protease nelfinavir (IV), indinavir (V) e ritonavir (VI).	86
APÊNDICE E - Atividades de proteinase (em unidades de absorvância) de <i>Candida dubliniensis</i> sensíveis ao fluconazol sob microaerofilia (I), concentrações subinibitórias de fluconazol (II) e combinação das duas condições (III).	87
APÊNDICE F - Atividade de proteinase dos isolados de <i>Candida dubliniensis</i> sensíveis ao fluconazol frente aos anti-retrovirais inibidores de protease nelfinavir (IV), indinavir (V) e ritonavir (VI).	88
APÊNDICE G - Atividades de proteinase (em unidades de absorvância) de <i>Candida dubliniensis</i> resistentes ao fluconazol sob microaerofilia (I), concentrações subinibitórias de fluconazol (II) e combinação das duas condições (III).	89
APÊNDICE H - Atividade de proteinase (unidades de absorvância) dos isolados de <i>Candida dubliniensis</i> resistentes ao fluconazol frente aos anti-retrovirais inibidores de protease nelfinavir (IV), indinavir (V) e ritonavir (VI).	90
APÊNDICE I - Biotipos de suscetibilidade de <i>Candida albicans</i> às toxinas “killer”.....	91
APÊNDICE J – Biotipos de suscetibilidade de <i>Candida dubliniensis</i> às toxinas “killer”.....	92
APÊNDICE K - Suscetibilidade ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dos isolados de <i>Candida dubliniensis</i> sensíveis ao fluconazol (FLC) frente a anfotericina B (AMB), caspofungina (CSP), cetoconazol (CTC), itraconazol (ITC), miconazol (MCN), voriconazol (VRC), 5-fluorocitosina (5-FC), ravuconazol (RVC) e terbinafina (TRB).	93
APÊNDICE L - Suscetibilidade ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dos isolados de <i>Candida dubliniensis</i> resistentes ao fluconazol (FLC) frente a anfotericina B (AMB), caspofungina (CSP), cetoconazol (CTC), itraconazol (ITC), miconazol (MCN), voriconazol (VRC), 5-fluorocitosina (5-FC), ravuconazol (RVC) e terbinafina (TRB).	94
APÊNDICE M - Concentrações Inibitórias Mínicas (CIM) de anfotericina B combinadas com itraconazol em isolados de <i>Candida dubliniensis</i> sensíveis ao fluconazol.....	95
APÊNDICE N - Concentrações Inibitórias Mínicas (CIM) de anfotericina B combinadas com voriconazol em isolados de <i>Candida dubliniensis</i> sensíveis ao fluconazol.	96

APÊNDICE O - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de terbinafina combinadas com itraconazol em isolados de <i>Candida dubliniensis</i> sensíveis ao fluconazol.	97
APÊNDICE P - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de terbinafina combinadas com voriconazol em isolados de <i>Candida dubliniensis</i> sensíveis ao fluconazol.	98
APÊNDICE Q - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de anfotericina B combinadas com itraconazol em isolados de <i>Candida dubliniensis</i> resistentes ao fluconazol.	99
APÊNDICE R - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de anfotericina B combinadas com voriconazol em isolados de <i>Candida dubliniensis</i> resistentes ao fluconazol.	100
APÊNDICE S - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de terbinafina combinadas com itraconazol em isolados de <i>Candida dubliniensis</i> resistentes ao fluconazol.	101
APÊNDICE T - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de terbinafina combinadas com voriconazol em isolados de <i>Candida dubliniensis</i> resistentes ao fluconazol.	102
APÊNDICE U - Interações resultantes da combinação de anfotericina B e itraconazol em <i>Candida dubliniensis</i>	103
APÊNDICE V - Interações resultantes da combinação de anfotericina B e voriconazol em <i>Candida dubliniensis</i>	104
APÊNDICE W - Interações resultantes da combinação de terbinafina com itraconazol em <i>Candida dubliniensis</i>	105
APÊNDICE X - Interações resultantes da combinação de terbinafina com voriconazol em <i>Candida dubliniensis</i>	106

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Características Gerais de <i>Candida dubliniensis</i>	19
2.2	Atividade de Proteinases Extracelulares e a Ação dos Anti-retrovirais	21
2.3	Suscetibilidade às toxinas “killer”	25
2.4	Suscetibilidade a Antifúngicos	25
2.4.1	Agentes Antifúngicos	25
2.4.2	Mecanismos de resistência de <i>C. dubliniensis</i> aos azólicos	31
2.4.3	Combinações terapêuticas	33
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivo Geral	38
3.2	Objetivos Específicos	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	Microrganismos	40
4.2	Agentes antifúngicos	41
4.3	Agentes anti-retrovirais	41
4.4	Indução de resistência ao fluconazol <i>in vitro</i>	41
4.5	Testes fenotípicos para a identificação de <i>Candida dubliniensis</i>	42
4.6	Avaliação da atividade de proteinases extracelulares.....	43
4.6.1	Atividade de proteinases frente a doses subinibitórias de fluconazol	44
4.6.2	Atividade de proteinases extracelulares em meio contendo anti-retrovirais ...	44
4.6.3	Análise estatística	44
4.7	Avaliação da suscetibilidade às toxinas “killer”	45
4.8	Testes de suscetibilidade aos antifúngicos	46
4.9	Avaliação das associações de antifúngicos frente a <i>Candida dubliniensis</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol.....	47
5	RESULTADOS	48
5.1	Indução de resistência ao fluconazol <i>in vitro</i>	48
5.2	Testes fenotípicos para a identificação de <i>C. dubliniensis</i>	48
5.3	Avaliação da atividade das proteinases extracelulares	49
5.4	Avaliação da suscetibilidade às toxinas “killer”	50

5.5	Testes de suscetibilidade aos antifúngicos	52
5.6	Avaliação das associações de antifúngicos frente a <i>C. dubliniensis</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol.....	53
6	DISCUSSÃO	55
6.1	Indução de resistência ao fluconazol <i>in vitro</i> e a identificação fenotípica dos isolados de <i>C. dubliniensis</i>	55
6.2	Avaliação da atividade das proteinases extracelulares	57
6.3	Avaliação da suscetibilidade às toxinas “killer”.....	59
6.4	Testes de suscetibilidade aos antifúngicos	60
6.5	Avaliação das associações de antifúngicos frente a <i>C. dubliniensis</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol.....	61
6.6	Considerações finais.....	63
7	CONCLUSÕES.....	64
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
9	APÊNDICES	83
10	ANEXOS	107
10.1	Preparação dos meios de cultura	107
10.2	Preparação das soluções	111

1 INTRODUÇÃO

No contexto das infecções fúngicas, as duas últimas décadas assistiram a um substancial aumento das micoses oportunistas, e as espécies do gênero *Candida* emergiram como uma das causas crescentes de infecções superficiais, cutâneas, mucocutâneas e sistêmicas (VIERA, 2006).

Durante aproximadamente 30 anos, a anfotericina B, reconhecidamente nefrotóxica, foi o único fármaco disponível no tratamento de infecções fúngicas disseminadas. A aprovação dos azólicos, especialmente o fluconazol, no final dos anos 80 e início dos anos 90 implicou em grandes avanços no tratamento seguro e eficaz de infecções fúngicas locais e sistêmicas (GHANNOUM & RICE, 1999). No entanto, o que se observou foi uma preocupante emergência de infecções por espécies de *Candida* não-*albicans* (COLOMBO et al, 2007), menos sensíveis ou até mesmo resistentes aos tratamentos disponíveis.

Embora seja responsável por menos de 1% dos casos de candidemia no Brasil, (COLOMBO et al, 2007) *Candida dubliniensis* assume importância porque frequentemente manifesta-se na forma de candidíase mucocutânea principalmente em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), evidenciando, portanto, um caráter patogênico neste grupo (SULLIVAN et al, 1995). Apresenta-se sensível ao mesmo espectro de antifúngicos que *Candida albicans*; no entanto, demonstra desenvolver facilmente estável resistência ao fluconazol *in vivo* e *in vitro* (MORAN et al, 1997).

Em *C. albicans*, a resistência ao fluconazol, além de limitar as opções terapêuticas, pode resultar no aumento da expressão de fatores de virulência como germinação, aderência às células epiteliais do hospedeiro, secreção de proteinases e fosfolípases (FEKETE-FORGÁCS, 2000) tornando as cepas muito mais virulentas *in vivo* do que as cepas sensíveis ao triazólico, incrementando o desafio à sobrevivência dos pacientes imunocomprometidos.

Neste contexto, as atuais circunstâncias justificam a necessidade de uma melhor caracterização do comportamento fenotípico bem como dos fatores de virulência de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol. A persistência das infecções fúngicas ao tratamento com fluconazol sugere a reavaliação dos demais antifúngicos disponíveis assim como a busca

por novas estratégias terapêuticas tais como as associações entre agentes antifúngicos de diferentes classes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características Gerais de *Candida dubliniensis*

Pela primeira vez descrita em 1995, *C. dubliniensis* foi inicialmente isolada de cavidades orais de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Possui muitas características morfológicas e fisiológicas semelhantes às de *C. albicans*, a espécie mais frequentemente isolada nas candidíases, o que contribuiu e justificou sua errônea identificação no passado (SULLIVAN et al, 1995).

A partir do reconhecimento de *C. dubliniensis* como uma nova espécie, a produção de tubos germinativos e a formação de clamidoconídios deixaram de ser características fenotípicas exclusivas de *C. albicans* (SULLIVAN et al, 1995), estimulando assim o desenvolvimento e a avaliação de uma grande variedade de técnicas de identificação em laboratórios de todo o mundo.

Um dos critérios fenotípicos primeiramente utilizados na diferenciação dessas espécies foi a produção de clamidoconídios, células grandes (três a quatro vezes maiores do que as células leveduriformes típicas), esféricas e espessas, cuja função ainda permanece desconhecida (STAIB & MORSCHHAUSER, 2006). Quando semeados em meios de cultura pobres em nutrientes, como o Ágar Arroz e o Ágar Fubá, e incubados à temperatura ambiente sob condições limitadas de oxigênio, os isolados de *C. dubliniensis* evidenciam dois ou três clamidoconídios nas extremidades de curtas pseudo-hifas, enquanto que isolados de *C. albicans* usualmente produzem somente um clamidoconídio nas extremidades de longas hifas (SULLIVAN et al, 1995). Mais tarde, outros estudos, comparando as duas espécies, mostraram ainda que, sob certas condições ambientais, somente *C. dubliniensis* formava pseudo-hifas e produzia clamidoconídios. Estas características foram uniformemente observadas com todas as cepas testadas, e embora a causa exata da produção dessas estruturas fosse desconhecida, foi sugerido que a sua presença em meios de cultura contendo sementes de níger (*Guizotia abyssinica*) ou girassol (*Helianthus annuus*) seria um fator exclusivo da espécie de *C. dubliniensis* (STAIB & MORSCHHAUSER 1999; AL-MOSAID et al, 2003). Recentemente, meios de cultura, como o Ágar Suco de Tomate (V8), Ágar Alecrim

(*Rosmarinus officinalis*) e Ágar DRBC (dicloran-rosa de bengala-cloranfenicol), também foram propostos como recursos alternativos na identificação de *C. dubliniensis* pela presença de colônias com bordas rugosas e clamidoconídios (ALVES et al, 2006; LORETO et al, 2006a; SCHEID et al, 2006).

Outros estudos ainda encontraram que isolados de *C. dubliniensis* poderiam ser diferenciados de *C. albicans* pela sua incapacidade de crescimento em Ágar Sabouraud quando incubadas a 45°C (PINJON et al, 1998) ou em Caldo Sabouraud Hipertônico após 96 horas (ALVES et al, 2002). Os isolados de *C. dubliniensis* também não demonstram assimilar xilose e α -metil-D-glicosídeo no sistema de identificação API 20C (SALKIN et al, 1998) e nem apresentam atividade lipolítica em Ágar Tween (SLIFKIN et al, 2000).

Curiosamente, apesar das semelhanças morfológicas entre essas espécies, enquanto *C. albicans* responde por aproximadamente 38% dos casos de candidemia no Brasil, *C. dubliniensis* parece ser somente um menor constituinte da microbiota normal oral e vaginal, sendo raramente encontrada como causa de infecção fúngica sistêmica (COLOMBO et al, 2007). *C. dubliniensis* é mais comumente associada à candidíase mucocutânea em pacientes imunocomprometidos, principalmente em casos recorrentes de infecção, após tratamento com fármacos azólicos, como o fluconazol. Além disso, uma prevalência relativamente alta de *C. dubliniensis* é observada nas cavidades orais de pacientes com diabetes e fibrose cística (SULLIVAN et al, 2004).

C. albicans e *C. dubliniensis* possuem o mesmo espectro de suscetibilidade aos antifúngicos. Entretanto, ao descrever pela primeira vez a resistência ao fluconazol em um grupo de isolados clínicos de *C. dubliniensis*, Moran et al (1997) mostraram que derivados resistentes ao fluconazol poderiam ser facilmente gerados a partir de isolados sensíveis após exposição *in vitro* ao azólico.

Nesse contexto, o crescente uso de agentes antifúngicos pode ter sido o responsável pela seleção de espécies como *C. dubliniensis* capazes de se adaptar à pressão antifúngica e persistir sobre aquelas espécies que são efetivamente suprimidas pelo tratamento (MARTINEZ et al, 2002). MARTINEZ et al (2002) observaram que, durante o tratamento de candidíase mucocutânea com fluconazol, a substituição de *C. albicans* por *C. dubliniensis* ocorreu em um considerável número (27%) de pacientes. Curiosamente, essa substituição não foi observada em pacientes cujas cepas de *C. albicans* eram capazes de desenvolver resistência ao fluconazol e a maior parte dos isolados de *C. dubliniensis* obtidos no final do estudo não demonstraram baixa suscetibilidade ao fluconazol. Na ausência de pressão

antifúngica, *C. albicans* predomina sobre *C. dubliniensis*. Porém na presença de concentrações subinibitórias de fluconazol, alguns fatores como a hidrofobicidade a 37°C, a coagregação com bactérias orais e sua habilidade para formar biofilmes são alterados, podendo favorecer a sobrevivência de *C. dubliniensis* na cavidade oral (MARTINEZ et al, 2002).

Apesar da facilidade com que desenvolve resistência ao fluconazol, a virulência de *C. dubliniensis* parece ser menor do que a de *C. albicans*. Em infecções experimentais em camundongos, *C. dubliniensis* geralmente permanece na forma leveduriforme, evidenciando menor invasividade quando comparada a *C. albicans*. A reação antiinflamatória relativamente intensa do hospedeiro, comparada à observada na infecção por *C. albicans*, sugere que essa espécie pode não ter um fator de virulência que suprima a reação imunológica. Finalmente, sua maior suscetibilidade aos polimorfonucleares, outro resultado que indica a menor virulência, pode ser devido a maior suscetibilidade ao peróxido de hidrogênio (VILELA et al, 2002).

É possível que longas exposições a concentrações subinibitórias de fluconazol também possam afetar a hidrofobicidade das células e, conseqüentemente, qualquer um dos eventos relacionados a essa propriedade. HAZEN et al (2000) verificaram que o pré-tratamento de células de *C. albicans* hidrofílicas e hidrofóbicas com concentrações subinibitórias de fluconazol aumentou significativamente sua suscetibilidade aos polimorfonucleares e a velocidade com que elas são atingidas.

2.2 Atividade de Proteinases Extracelulares e a Ação dos Anti-retrovirais

Considerando que *C. albicans* e *C. dubliniensis* estão intimamente relacionadas, é provável supor que a última possua fatores de virulência, como a secreção de proteinases extracelulares, que sejam similares aos descritos para *C. albicans* (BORG-VON ZEPELIN et al, 2002).

A atividade de proteinase em *C. albicans* é atribuída a uma família multigênica de aspartil proteinases com pelo menos nove membros denominados SAP1-SAP9 (DE BERNARDIS et al, 2001). *In vitro*, a secreção da enzima é pequena quando o meio de cultura contém simples fontes de nitrogênio (aminoácidos ou sais de amônio), mas é elevada quando

possui, como única fonte de nitrogênio, a hemoglobina ou albumina bovina (RAY et al, 1991). Ao contrário de outras aspartil proteinases, as proteinases das espécies de *Candida* podem hidrolisar colágeno, queratina e mucina. Além disso, degradam anticorpos e citocinas. São inibidas por pepstatina A e derivados sintéticos, que também inibem as aspartil proteinases do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), essenciais à maturação do vírus para a produção de vírions infecciosos (DE BERNARDIS et al, 2001).

De acordo com a revisão de Ray et al (1991), a secreção de proteinase desempenha um importante papel na patogênese de *Candida*. A produção dessa enzima está diretamente correlacionada com a aderência dos blastoconídios nas células do hospedeiro, e com a facilitação do dano celular e invasão dos tecidos pelas hifas através da degradação proteolítica da queratina e do colágeno.

Embora outros fatores, além da secreção de proteinase, estejam relacionados com a patogenicidade das espécies de *Candida*, diversos experimentos em camundongos utilizando cepas deficientes de produção de proteinase (KWON-CHUNG et al, 1985; KONDOH et al, 1987; ROSS et al, 1990) demonstraram que existe uma forte correlação entre a secreção da enzima e o grau de virulência das cepas.

Até 1995, a atividade dessa enzima tinha sido somente detectada em filtrados de culturas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* (MACDONALD, 1984). Porém, nesse ano, McCullough et al descreveram atividade de proteinase em um subgrupo de cepas atípicas de *C. albicans*, as quais mais tarde foram reconhecidas como *C. dubliniensis* (SULLIVAN et al, 1995). Além de apresentarem maior aderência às células epiteliais bucais, essas cepas possuíam uma atividade da enzima significativamente maior do que as cepas típicas de *C. albicans*.

Embora Gilfillan et al (1998) tenham identificado sete genes homólogos aos SAP1-SAP7 de *C. albicans* em cepas de *C. dubliniensis* isoladas das cavidades orais de pacientes HIV positivo e indivíduos saudáveis, alguns estudos comparando a atividade de proteinase entre as duas espécies evidenciaram pouca ou nenhuma secreção da enzima em *C. dubliniensis* (HANNULA et al, 2000; FOTEDAR & AL-HEDAITH, 2005). Tais discordâncias possivelmente estejam relacionadas ao “switching” fenotípico de alta frequência e à grande variabilidade genotípica apresentada pela espécie (HANNULA et al, 2000). Desse modo, resta determinar se os produtos desses genes têm as mesmas atividades e funções patológicas ou são produzidos sob as mesmas condições ambientais como os homólogos de *C. albicans*.

A relação entre a atividade de proteinase e o grau de resistência de *C. albicans* aos azólicos ainda não foi bem estabelecida. Wu et al (2000) observaram que cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, quando incubadas em meio contendo concentrações subinibitórias do azólico, apresentaram um aumento na atividade de proteinase que correspondia ao grau de resistência ao fármaco. Por outro lado, Copping et al (2005) encontraram que um isolado resistente ao fluconazol exibiu uma redução da atividade de proteinase quando exposto às mesmas condições do estudo anterior. Além disso, dos quatro isolados que mostraram um aumento na atividade de proteinase, dois eram suscetíveis aos azólicos e dois eram resistentes. Os mesmo autores, ainda baseados em seus resultados, sugerem que o aumento na atividade de proteinase pode ser induzido não somente por azólicos, mas também por 5-fluorocitosina e caspofungina, como um mecanismo de defesa da levedura em resposta à exposição de aos agentes antifúngicos em concentrações subinibitórias.

Fekete-Forgács et al (2000) demonstraram que uma cepa de *C. albicans* sensível ao fluconazol, quando induzida à resistência, aumentava a porcentagem de produção de tubos germinativos em quase 90% em relação à amostra sensível. Além disso, a cepa resistente apresentava uma aderência a células epiteliais bucais e à superfície acrílica, e atividade de proteinase e fosfolipase muito superiores à cepa sensível. A virulência dessa cepa em um modelo animal era também maior do que a cepa original. Com o desenvolvimento da resistência ao fluconazol, portanto, acredita-se que há um aumento da virulência *in vivo*.

De fato, Borg-von Zepelin et al (2002) mais uma vez observaram que na presença de fluconazol, a maioria dos isolados de *C. dubliniensis*, diferentemente de *C. albicans*, tornavam-se mais aderentes às células epiteliais. Paralelamente a isso, a quantidade de proteinase parecia aumentar na superfície do fungo.

Desde a introdução dos fármacos anti-retrovirais inibidores de protease no coquetel terapêutico utilizado no tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida, tem sido observado que as infecções fúngicas, inclusive as candidíases orais, estão cada vez mais raras em pacientes infectados pelo HIV (HOEGL et al, 1998). Estudos clínicos, utilizando pacientes HIV positivo tratados com anti-retrovirais inibidores de protease, evidenciaram uma notável redução na incidência de candidíase oral que não podia ser explicada somente pela elevação da contagem de células CD4+ circulantes e a conseqüente reconstituição do sistema imune (CAUDA et al, 1999; CASSONE & CAUDA, 2002). Quando estabelecidos dois grupos de pacientes sob regimes diferentes de anti-retrovirais (inibidores de transcriptase reversa e inibidores de protease), era verificado que dos 80% dos pacientes proteinase-

positivos no começo do tratamento, mais da metade não apresentava mais proteinase em sua saliva depois de 2 semanas de tratamento; após 30 dias de tratamento, quase todos os pacientes tinham se convertido para proteinase-negativos. Por outro lado, os pacientes proteinase-positivos que recebiam anti-retrovirais inibidores de transcriptase reversa mantinham sua positividade depois de 30 dias, e a maioria possuía proteinase na saliva até o final de 180 dias de acompanhamento (CASSONE & CAUDA, 2002).

Nesse sentido, diversos estudos (BORG-VON ZEPPELIN et al, 1999; GRUBER et al, 1999; BEKTIC et al, 2001; KORTING et al, 2003; SCHALLER et al, 2003; BLANCO et al, 2003) conseguiram demonstrar *in vitro* a redução da atividade de proteinase e a conseqüente atenuação da virulência de *C. albicans* frente aos anti-retrovirais inibidores de protease.

De acordo com Korting et al (1999) e Schaller et al (2003), os efeitos inibitórios de pepstatina A, saquinavir e indinavir são equivalentes. Contudo, o ritonavir parece ser o fármaco anti-retroviral inibidor de protease mais efetivo na inibição da atividade de proteinase de cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes infectados ou não por HIV. Blanco et al (2003) ainda verificaram que o ritonavir, e, em menor extensão, o saquinavir, além de reduzirem a atividade das proteinases de *C. albicans*, desaceleram a taxa de crescimento do fungo.

A redução da viabilidade e do crescimento do fungo pelo indinavir foi observada por Gruber et al (1999). Entretanto, somente uma menor porcentagem de *C. albicans* tratadas com o anti-retroviral evidenciavam severo dano celular. Também, algumas cepas mantinham a habilidade de formar hifas, mesmo a uma reduzida taxa em relação a células não tratadas, quando transferidas para meio de cultura livre de indinavir (GRUBER et al, 1999).

Uma vez que as proteinases desempenham um importante papel na aderência das células fúngicas às células epiteliais humanas, os anti-retrovirais parecem também reduzir esse fenômeno em até 70% (BORG-VON ZEPPELIN et al, 1999). Saquinavir inibe a aderência de *C. albicans* mais fracamente do que o ritonavir, porém mais fortemente do que indinavir. Todavia, o saquinavir não somente exibe atividade antiproteínásica, mas também evidencia, em maiores concentrações, atividade fungicida *in vitro* (BEKTIC et al, 2001).

Um aumento na suscetibilidade de isolados de *Candida* resistentes a azólicos é observado quando os mesmos são expostos ao ritonavir antes do teste de suscetibilidade, ou quando o fármaco é adicionado ao meio de cultura. A porcentagem de isolados resistentes diminui consideravelmente, sugerindo, portanto, um possível sinergismo nas combinações de itraconazol ou cetoconazol com o anti-retroviral inibidor de protease (MIGLIORATI et al, 2004).

2.3 Suscetibilidade às toxinas “killer”

As toxinas “killer” são compostos glicoprotéicos, de baixo peso molecular, que atuam formando poros na membrana citoplasmática alterando assim a permeabilidade celular das leveduras. São produzidas por nove espécies dos gêneros *Hansenula* e *Pichia*, as quais são imunes a essas toxinas (BENDOVA, 1986; KAGAN, 1983).

De acordo com a suscetibilidade exibida pela amostra, é possível classificá-las em biotipos com base em um código de três dígitos capaz de distinguir 512 biotipos de “killer” para isolados de *C. albicans* (POLONELLI et al, 1983). No Brasil, CANDIDO et al (1995) conseguiram demonstrar que dois pacientes albergavam mesmo biotipo “killer” em diferentes espécimes clínicos, e ainda, um mesmo biotipo isolado de hemoculturas realizadas em ocasiões distintas, comprovando a utilidade do método para estabelecer as eventuais fontes de infecção por leveduras.

Os significativos avanços trazidos pelas técnicas moleculares tornaram ultrapassadas as técnicas de biotipagem, com significativas vantagens. Por outro lado, estudos sobre a avaliação do comportamento fenotípico de *C. dubliniensis*, sensíveis ou resistentes, frente a esta técnica, até este ano ainda não tinham sido realizados. O perfil de suscetibilidade de *C. dubliniensis* frente às toxinas “killer” pode se constituir em técnica vantajosa para sua identificação preliminar, o que justifica sua inclusão neste estudo.

2.4 Suscetibilidade a Antifúngicos

2.4.1 Agentes Antifúngicos

Até a década de 1940, relativamente poucos agentes estavam disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Nesse sentido, o desenvolvimento dos antifúngicos poliênicos, especialmente a anfotericina B, representou um grande avanço na micologia médica, uma vez que foi o fármaco mais utilizado no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas até o início da década de 90 (MAERTENS, 2004).

A anfotericina B é um antifúngico poliênico com espectro de atividade muito amplo. É indicada no tratamento de infecções fúngicas que potencialmente ameaçam a vida, incluindo aspergilose, blastomicose, coccidioidomicose, criptococose, histoplasmose, paracoccidioidomicose, esporotricose, candidíase sistêmica e zigomicose (GUBBINS & ANAISSIE, 2002). Atua principalmente por união ao ergosterol, componente biorregulador da fluidez e da assimetria fosfolipídica da membrana celular fúngica. A anfotericina B interage produzindo poros aquosos compostos por anéis de oito moléculas ligadas hidrofobicamente aos esteróis da membrana, acarretando a morte celular através da desestabilização na membrana plasmática seguida de alteração de permeabilidade e extravasamento de componentes citoplasmáticos vitais (GHANNOUM & RICE, 1999).

Embora com menor afinidade, o deoxicolato de anfotericina B também se une ao colesterol das membranas celulares dos seres humanos, o que condiciona a maioria de seus efeitos adversos. Parece que a nefrotoxicidade, a principal complicação que deve ser levada em consideração, é mediada em parte pelo efeito da anfotericina B diretamente nas células tubulares renais, resultando em necrose tubular aguda, vasoconstrição e redução da filtração glomerular. Conseqüentemente, a incidência de falência renal aguda associada à terapia de anfotericina B é muito alta e pacientes que desenvolvem esse quadro enquanto recebem o fármaco freqüentemente vão ao óbito (BATES et al, 2001).

Atualmente a anfotericina B também se encontra disponível em outras formulações, como complexo lipídico, dispersão coloidal ou forma lipossomal. Embora todas mantenham o mesmo espectro de atividade do deoxicolato de anfotericina B, elas parecem mais potentes, menos nefrotóxicas e diferem entre si com respeito a propriedades bioquímicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas (DUPONT, 2002).

A 5-fluorocitosina é a única representante da classe das pirimidinas. Este agente, após uma reação de desaminação na célula fúngica, é convertido em duas formas ativas: 5-monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP) e trifosfato de 5-fluoruridina (FURTP). O FdUMP é um potente inibidor da timidilato sintetase, enzima responsável pela síntese de DNA fúngico. Já o FURTP, quando é incorporado ao RNA fúngico no lugar do ácido uridílico, causa alteração na aminoacilação do RNAt *in vitro* e desequilíbrio do pool interno bem como prejuízo na síntese de proteínas e carboidratos (WALDORF & POLAK, 1983).

O agente pirimidínico possui excelente espectro de atividade e potência frente a espécies de *Candida* e outras leveduras. Tem a vantagem da administração oral e produz poucos efeitos tóxicos. Entretanto, sua utilização como único agente no tratamento de micoses

não é recomendado uma vez que uma alta prevalência de resistência primária e secundária está associada a esse fármaco (TITSWORTH & GRUNBERG, 1973). Por outro lado, a sua combinação com anfotericina B ou azólicos é considerada bastante útil no tratamento de micoses invasivas causadas por espécies de *Candida* e *Cryptococcus* (SCHWARZ et al, 2003).

O miconazol foi lançado na década de 1960 junto a outros dois compostos tópicos, clotrimazol e econazol. Foi ainda o primeiro azólico disponível para administração parenteral (MAERSTENS, 2004). Como os outros azólicos, ele interfere na biossíntese do ergosterol atingindo primariamente uma hemoproteína que co-catalisa a 14 α -demetilação do lanosterol. A inibição da 14- α -lanosterol demetilase leva a uma depleção do ergosterol e acumulação de esteróis precursores, como esteróis 14 α -metilados (lanosterol, 4,14-dimetilzimosterol, e 24-metilenodihidrolanosterol), resultando na formação de uma membrana plasmática com função e estrutura deficientes (GHANNOUM & RICE, 1999).

Porém, em altas concentrações, o miconazol pode causar um dano direto na membrana que resulta na quebra dos constituintes celulares lipídicos. O fármaco possui um limitado espectro de atividade incluindo dermatófitos, espécies de *Candida*, fungos dimórficos e *P. boydii*. Uma vez que foi associada toxicidade ao veículo usado para administração intravenosa, a efetividade do fármaco limitou-se ao uso tópico (MAERTENS, 2004).

Em 1981, o cetoconazol foi aprovado para uso sistêmico. Por quase uma década prevaleceu como o único agente oral disponível para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Até a introdução dos triazólicos, o cetoconazol era particularmente útil no tratamento de alguns tipos de candidíase, blastomicose, histoplasmose. Entretanto, era inativo frente a muitos isolados de *Candida* e *Aspergillus* (TERRELL, 1999).

Com o passar dos anos, um número clinicamente relevante de falhas do cetoconazol se tornaram evidentes: absorção influenciada pelo pH gástrico, indisponibilidade de formulação intravenosa, baixa penetração no líquido cerebrospinal, ação unicamente fungistática, efeitos colaterais gastrintestinais podendo ainda causar hepatite fatal. Quando excedendo 400 mg diárias, o cetonazol também pode inibir a síntese de testosterona e cortisol resultando em uma variedade de distúrbios endócrinos e interações medicamentosas (MAERTENS, 2004).

Essas situações levaram a busca por um segundo grupo químico de derivados azólicos, chamados triazólicos. Em geral, os triazólicos demonstraram um espectro de atividade muito mais amplo e reduzida toxicidade quando comparados aos imidazólicos. O fluconazol,

aprovado para uso no início dos anos 90, cobre muitas das deficiências dos imidazólicos. Diferente do cetoconazol, o bis-triazólico é altamente solúvel em água e pode ser administrado intravenosamente a pacientes seriamente doentes, não é alterado por mudanças na acidez gástrica e possui menor risco de hepatotoxicidade. Além disso, penetra no fluido cerebrospinal extremamente bem, alcançando níveis de quase 80% no sangue. Entretanto, muitas das mesmas interações medicamentosas apresentadas pelo cetoconazol são também possíveis para o fluconazol (PATTON et al, 2001; MAERTENS, 2004).

O fluconazol é aprovado para o tratamento de candidíase vaginal, orofaríngea, esofágica e meningite criptocócica, e na profilaxia para diminuir a incidência de candidíase em pacientes submetidos a transplantes de medula óssea que recebem quimioterapia citotóxica (GUBBINS & ANAÏSSIE, 2002). O fluconazol também é indicado como alternativa à anfotericina B no tratamento de coccidioidomicose, histoplasmose e blastomicose, e para esporotricose quando o itraconazol não pode ser utilizado (TERRELL, 1999).

Contudo, o entusiasmo inicial pelo fluconazol foi desafiado por dois eventos: o envolvimento de um maior espectro de patógenos nas infecções fúngicas e a emergência da resistência aos azólicos. Isso porque, embora *C. albicans* permaneça a levedura mais comumente encontrada, estudos recentes demonstraram um aumento em relação à incidência de infecções por espécies de *Candida* não-*albicans*, menos virulentas, mas por outro lado, menos sensíveis ao fluconazol (KRCMERY & BARNES, 2002; HAJJEH et al, 2004; COLOMBO et al, 2007).

O itraconazol, por sua vez, gradualmente substituiu o cetoconazol como tratamento de escolha para casos não-invasivos de histoplasmose, blastomicose e paracoccidioidomicose. O fármaco possui consideráveis vantagens sobre o fluconazol no tratamento de aspergilose e esporotricose. Entretanto, o fluconazol demonstra um perfil farmacológico e toxicológico mais favorável. Diferente do fluconazol, o itraconazol é altamente lipídico e quando foi lançado pela primeira vez, foi formulado apenas em cápsulas. Por causa da errática absorção e baixas concentrações sanguíneas estarem associadas a falhas terapêuticas, foi desenvolvida uma formulação oral contendo hidroxipropil- β -ciclodextrina como solubilizante, cuja biodisponibilidade é significativamente maior do que a apresentada pelas cápsulas (TERRELL, 1999).

Os resultados *in vitro* evidenciam boa atividade de itraconazol frente aos isolados de *C. albicans*, detectando apenas 1% de resistência ao triazólico. Apesar disso, para isolados

com baixa suscetibilidade ao fluconazol, foi observado que as concentrações inibitórias mínimas para o itraconazol eram proporcionalmente maiores, indicando resistência cruzada entre os fármacos (BARCHIESI et al, 1994).

Em estudo realizado por Kuriyama et al (2005), a resistência ao fluconazol foi detectada em somente 0,3% das cepas de *C. albicans* e 10% das cepas de *C. glabrata*. Das 521 cepas testadas, somente cinco de *C. albicans* eram resistentes ao itraconazol, enquanto que em *C. glabrata* e *C. krusei*, a resistência ocorria em 23,7% e 14,3% dos isolados, respectivamente.

Aprovado em 2002, o voriconazol, estruturalmente relacionado ao fluconazol, é oralmente e parenteralmente ativo; e diferentemente do itraconazol, sua absorção não é afetada pelo pH gástrico (JEU et al, 2003). Exibe uma farmacocinética complexa, mas apresenta uma boa penetração no líquido cerebrospinal e sistema nervoso central (MAERTENS, 2004). Comprovou eficácia no tratamento de aspergilose invasiva e outras infecções por fungos filamentosos (CAPILLA et al, 2001; KULLBERG et al, 2005). Exceto frente a *C. glabrata*, que permanece a espécie menos sensível, o fármaco possui excelente atividade *in vitro* frente às espécies de *Candida*, incluindo cepas de *C. krusei* (RAMOS et al, 1999; SWINNE et al, 2005).

Utilizando um estudo randomizado, Kullberg et al (2005) confirmaram que o voriconazol evidencia igual atividade nas candidemias refratárias aos tratamentos com azólicos comparado à administração não-antagonista de anfotericina B seguida de fluconazol. O sucesso do tratamento dos dois grupos ocorria em 65 e 71% dos pacientes. Por isso, o voriconazol parece tão efetivo quanto às estratégias mais comumente utilizadas de anfotericina B seguida de fluconazol em pacientes não-neutropênicos para o tratamento de candidemia, incluindo *C. albicans* e espécies de *Candida* não-*albicans*. Ainda, o amplo espectro do fármaco associado a maior segurança e a disponibilidade de formulações intravenosas e orais, permitem considerá-lo uma importante opção terapêutica para os casos de candidemia.

Apesar da eficácia, segurança e amplo espectro, o voriconazol ainda não é o azólico ideal porque não perdeu as interações medicamentosas e seus efeitos colaterais clássicos dos azólicos. Nesse contexto, uma segunda geração de compostos triazólicos está sob as fases clínicas investigacionais II e III. Entre eles, destaca-se o ravuconazol, que possui maior potência e espectro de atividade mais amplo do que fluconazol e itraconazol frente a virtualmente todas as espécies de *Candida* (GUPTA et al, 2005).

Embora ravuconazol seja ativo frente a isolados de *Candida* spp com reduzida sensibilidade ao fluconazol, evidências de resistência cruzada foram demonstradas, especialmente com isolados de *Candida glabrata* resistentes ao fluconazol. A resistência cruzada entre fluconazol e ravuconazol (e provavelmente outros triazólicos de amplo espectro) é tal que o resultado da CIM do fluconazol pode ser usado para prever a suscetibilidade ao ravuconazol (DIEKEMA et al, 1999; PFALLER et al, 2004a).

Disponível para uso oral e tópico, a terbinafina pertence à classe das alilaminas, quimicamente e funcionalmente distinta da classe dos azólicos. Sua atividade antifúngica se deve à inibição da enzima esqualeno-epoxidase, que catalisa a conversão de esqualeno a 2,3-oxidoesqualeno, resultando no bloqueio da síntese do ergosterol. Além disso, possui uma atividade extra devido a conseqüente acumulação intracelular de esqualeno, o que causa a ruptura das membranas das células fúngicas. É altamente efetiva *in vitro* e *in vivo* frente a fungos dermatófitos, *Cryptococcus neoformans* e alguns isolados de *C. albicans* resistentes aos azólicos (GHANNOUM & RICE, 1999).

A mais nova classe de agentes antifúngicos é representada pelas equinocandinas, que são constituídas de lipopeptídeos derivados de produtos naturais de fermentação fúngica. A caspofungina é o único agente dessa classe comercializado, embora outros compostos similares estejam em desenvolvimento. Essa classe atua inibindo a β -(1,3)glucana-sintetase, enzima responsável pela síntese de β -(1,3)glucana, componente da parede celular fúngica. Essa equinocandina possui potente ação fungicida frente a muitas espécies de *Candida* (GUBBINS & ANAISSIE, 2002). Devido a esse distinto modo de ação, evidenciam toxicidade seletiva frente a células fúngicas devido à ausência da molécula de glucana nas células dos mamíferos (ARIKAN et al, 2005).

A caspofungina foi aprovada para o tratamento de candidemia, candidíase mucocutânea e aspergilose invasiva (PFALLER et al, 2003). Provou ser altamente ativa frente a biofilmes de *C. albicans*, e uma de suas mais significantes vantagens é a maior atividade frente a isolados de *Candida* resistentes a azólicos (PFALLER et al, 2003; PFALLER et al, 2004b).

A caspofungina parece ser, similarmente, ativa frente a isolados sensíveis e resistentes a itraconazol e fluconazol. Sua atividade, porém, é um pouco menos pronunciada frente a *C. parapsilosis* comparada a outras espécies (ARIKAN et al, 2005) e o primeiro caso de cepa resistente à caspofungina já foi descrito (KROGH-MADSEN et al, 2006).

Nesse contexto, Pfaller et al (1999) avaliaram a atividade *in vitro* dos agentes antifúngicos disponíveis frente a 71 isolados de *Candida dubliniensis*. Noventa e sete por cento destes apresentavam-se sensíveis ao fluconazol, 100% eram sensíveis a itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B. Voriconazol, ravuconazol e caspofungina também eram muito ativos frente a 99% dos isolados. Contudo, cinco isolados de *C. dubliniensis* evidenciavam menor sensibilidade ao fluconazol. Mesmo assim, as CIMs de itraconazol, voriconazol e ravuconazol permaneciam baixas para essas cepas, indicando uma possível inexistência de resistência cruzada para os azólicos nessa espécie.

2.4.2 Mecanismos de resistência de *C. dubliniensis* aos azólicos

Os fármacos azólicos atuam inibindo uma enzima pertencente à rota biossintética do ergosterol conhecida como lanosterol 14- α -demetilase, que é codificada pelo gene ERG11 em *Candida*. A exposição das células fúngicas aos azólicos causa depleção de ergosterol e acumulação de esteróis 14- α -metilados, tais como lanosterol e 14- α -metil-3,6-diol, que afetam a estrutura da membrana, alterando sua fluidez e a atividade das enzimas a ela ligadas (GHANNOUM & RICE, 1999).

Segundo Pinjon et al (2005), os mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento de resistência aos azólicos em *Candida* podem ser resultantes de mutações ou de elevados níveis de expressão dos genes que podem acarretar: (1) ativação das bombas de efluxo, dificultando a acumulação dos fármacos nas células fúngicas; (2) menor afinidade da enzima-alvo pelos fármacos azólicos; (3) elevação do conteúdo celular da enzima-alvo; (4) e inativação de outras enzimas da rota biossintética do ergosterol, como a esterol Δ 5,6-dessaturase.

A remoção dos agentes azólicos dentro das células fúngicas por meio de bombas de efluxo tem sido apontada como o principal fator envolvido na resistência em isolados clínicos de *C. dubliniensis* (MORAN et al, 1998; PEREA et al, 2002a). Análises moleculares de isolados resistentes de *C. dubliniensis* permitiram identificar os genes CdCDR1 e CdCDR2 codificadores das proteínas transportadoras pertencentes à família ABC (“ATP-binding cassette”), e CdMDR1 codificador da família facilitadora das bombas de efluxo (MORAN et al, 1998). No entanto, o fenótipo de resistência ao fluconazol em *C. dubliniensis* tem sido

associado primariamente ao aumento da expressão do gene CdMDR1 codificador do CdMDR1p, proteína responsável pelo aumento do efluxo dependente de energia de fluconazol; enquanto que CdCDR1 medeia apenas a redução da suscetibilidade ao cetoconazol e itraconazol, e CdCDR2 não é expresso (WIRSCHING et al, 2001; MORAN et al, 2002; PEREA et al, 2002a).

Em *C. dubliniensis*, as mutações que afetam a afinidade da enzima lanosterol 14- α -demetilase pelos fármacos azólicos foram descritas por Perea et al (2002). A comparação de seqüências de nucleotídeos dos genes ERG11 de células sensíveis e de células resistentes ao fluconazol permitiu a identificação de 14 mutações nucleotídicas as quais levaram a 14 substituições de aminoácidos. Quatro dessas mutações já tinham sido encontradas para isolados clínicos de *C. albicans* com baixa sensibilidade ao azólico; e duas delas pareceram afetar a afinidade da enzima pelos azólicos.

Já que freqüentemente aparece em combinação com outras alterações associadas à resistência das células fúngicas aos azólicos, a contribuição da elevação do conteúdo celular de lanosterol 14- α -demetilase é de difícil avaliação. Semelhantemente aos isolados clínicos de *C. albicans*, os isolados de *C. dubliniensis* com menor suscetibilidade a azólicos apresentam uma superexpressão do gene ERG11, mediando um aumento da concentração de enzima e conseqüentemente um aumento do conteúdo celular de ergosterol, claramente associado à menor sensibilidade aos azólicos (PINJON et al, 2003; PEREA et al, 2002a). No entanto, a relevância dos níveis elevados de enzima mediando a resistência em *C. dubliniensis* ainda não é conhecida (PINJON et al, 2003).

Modificações na rota biossintética do ergosterol, tais como defeitos na etapa de $\Delta 5,6$ dessaturação, também podem estar associadas à resistência aos azólicos. Após exposição *in vitro* de células de *C. dubliniensis* ao itraconazol, Pinjon et al (2003) observaram que o gene CdERG3 codificador da $\Delta 5,6$ dessaturase sofre mutações com perda funcional, permitindo assim a acumulação de 14 α -metil-fecosterol ao invés do metabólito tóxico 14 α -metil-3,6-diol que normalmente é acumulado durante o tratamento com azólicos. O prejuízo à rota biossintética do ergosterol provoca alterações na composição da membrana plasmática, conseqüentemente afetando o funcionamento das bombas de efluxo, o qual passa a ser compensado pela superexpressão dos genes CdERG11 e CdCDR1. Desse modo, se não amplamente investigada, a resistência aos azólicos pode estar erroneamente atribuída à

aparente superexpressão dos genes codificadores da enzima-alvo e das proteínas transportadoras de membrana (PINJON et al, 2003).

Portanto, em *C. dubliniensis*, o fenômeno de resistência é multifatorial e complexo, resultante não somente da superexpressão dos genes codificadores dos transportadores das bombas de efluxo ou da superexpressão de genes portando mutações pontuais que interferem na atividade da enzima-alvo, mas da combinação de diferentes mecanismos moleculares (MORAN et al, 1998; PEREA et al, 2002a).

2.4.3 Combinações terapêuticas

As elevadas taxas de mortalidade causadas pelas infecções fúngicas e a eficácia relativamente limitada dos fármacos disponíveis estimularam um grande interesse pelo uso de combinações entre antifúngicos de amplo espectro no tratamento dessas infecções (JOHNSON et al, 2004). Em revisão sobre o assunto, Vazquez (2003) aponta as principais razões para a utilização da associação de dois ou mais antifúngicos, entre elas: (1) a obtenção de atividade fungicida através da associação de dois agentes fungistáticos; (2) a possibilidade de diminuição da dosagem dos fármacos, diminuindo os efeitos colaterais e a toxicidade, mantendo a eficácia, e conseqüentemente retardando a emergência de mutantes resistentes ao fármaco; (3) a obtenção de um amplo espectro de tratamento para pacientes seriamente doentes suspeitos de estarem acometidos por infecções mistas ou infecções por patógenos resistentes. Por outro lado, o mesmo autor ainda salienta que a combinação de antifúngicos no tratamento das micoses pode acarretar desvantagens como: (1) a redução na eficácia clínica através da interação antagonista dos agentes; (2) aumento do potencial para interações e toxicidades medicamentosas; (3) elevação dos gastos com medicamentos que juntos podem não possuir benefício clínico comprovado.

Com a finalidade de prever a potencial eficácia terapêutica das combinações de antifúngicos, foram desenvolvidos métodos para quantificar seus efeitos sobre o crescimento fúngico *in vitro*. Um dos mais conhecidos e mais simples utilizados na detecção da interação entre os fármacos é o método de “checkerboard”. Como em um tabuleiro de xadrez, diluições seriadas de antifúngicos em caldo são distribuídas bidimensionalmente em microplacas e são

inoculadas com uma concentração padrão do microrganismo a ser testado, de modo que um grande número de concentrações de antifúngico, em diferentes proporções, possa ser avaliado simultaneamente. Essa técnica baseia-se no cálculo do índice da concentração inibitória fracionária (ICIF) para demonstrar se a concentração inibitória mínima (CIM) de um fármaco está reduzida (sinergismo), inalterada (indiferença) ou aumentada (antagonismo) na presença de outro fármaco (CHAMBERS & SANDE, 1996; ODDS, 2003).

Todavia, a técnica de “checkerboard” fornece apenas uma medida relativa de potência para a combinação e ainda deixa a desejar quanto à dinâmica da interação dos antifúngicos. Estudos de curva de ação fungicida podem ajudar na elucidação da farmacodinâmica da combinação de antifúngicos através da medição dos efeitos da interação entre os fármacos sobre a velocidade e a extensão da ação fungicida sobre as células fúngicas (LEWIS et al, 2002). Nesse método, culturas idênticas são incubadas simultaneamente com antifúngicos adicionados isoladamente ou em combinação. Se, por exemplo, uma combinação de antifúngicos tiver ação fungicida mais rápida do que qualquer fármaco isoladamente, o resultado é denominado sinergismo (CHAMBERS & SANDE, 1996).

Enquanto alguns estudos demonstram uma excelente concordância entre esses dois métodos (LEWIS et al, 2002), a maior parte não a demonstra, e controvérsias sobre a comparabilidade dos resultados gerados por essas técnicas existem. Nesse sentido, estudos avaliando as interações da combinação de anfotericina B com azólicos têm fornecido resultados conflitantes, incluindo antagonismo, indiferença e aditividade, ou mesmo sinergismo. Além de meios de cultura, pH, temperatura e concentração do inóculo empregados, a ordem de administração (LEWIS et al, 1998), a duração da exposição e a concentração dos agentes (ERNST et al, 1998) bem como a natureza lipofílica do azólico (SCHEVEN & SCHWEGLER, 1995) e a suscetibilidade dos isolados ao fluconazol (LOUIE et al, 1999a) parecem ser importantes parâmetros a influenciar na atividade dessas combinações em espécies de *Candida*.

Diversos mecanismos têm sido sugeridos para os diferentes tipos de interação observados nas espécies de *Candida* utilizando combinações de poliênicos com azólicos. O efeito antagonista, observado pela maior parte dos estudos (DUPONT & DROUHET, 1979; SUD & FEINGOLD, 1983; VAN ETEN et al, 1991; MARTIN et al, 1994; VAZQUEZ et al, 1996; SAMARANAYAKE et al, 2001; SHIN & PYUN, 2004), é sugerido como o resultado do bloqueio da síntese do ergosterol da membrana celular fúngica pelos azólicos, potencialmente eliminando o sítio de ação da anfotericina B. Isso aumenta a suscetibilidade

das células fúngicas à morte pelos fagócitos (SHIMOKAWA & NAKAYAMA, 1992). Vazquez et al (1996) ainda propõe que a exposição das células leveduriformes ao fluconazol ativa as bombas de efluxo, as quais direta ou indiretamente reduziriam a afinidade ou o impacto de anfotericina B na membrana celular. Além disso, a anfotericina B interage com o ergosterol e causa a inibição irreversível da ATPase da membrana.

Por outro lado, a ausência de antagonismo entre poliênicos e azólicos (BOLARD, 1986) é explicada pelo fato de que a anfotericina B, além de ligar-se ao ergosterol e aumentar a porosidade da membrana fúngica, também parece induzir o extravasamento do material citoplasmático das células fúngicas sem a participação direta da ligação ao ergosterol. Além do mais, a suscetibilidade das células fúngicas à anfotericina B dependeria não somente da quantidade de ergosterol mas também da composição total de fosfolípidios da membrana fúngica. Segundo Sanati et al (1997), a saturação das cadeias de ácidos graxos associada à peroxidação lipídica pode representar um papel na interação da anfotericina B com a membrana fúngica já que o fluconazol apenas inibe parcialmente a síntese de ergosterol. Portanto, o ergosterol residual da membrana que ficaria presente nas células pré-tratadas com fluconazol poderia servir de alvo para a ligação da anfotericina B.

Além disso, sugere-se que os efeitos aditivos ou mesmo sinérgicos observados pela combinação desses agentes (ODDS, 1982; SUGAR 1991) sejam resultantes da desestabilização da membrana fúngica pela ligação do poliênico, facilitando assim a entrada do azólico. Uma vez internalizado, o azólico poderia provocar outros efeitos no metabolismo fúngico além da mera inibição da síntese do ergosterol.

Uma vez que Scheven & Schwengler (1995) sugeriram que ligações do tipo não-específicas e não-covalentes, como as de Van der Waals, poderiam estar envolvidas na afinidade dos fármacos pelos ligantes celulares, a afinidade do fluconazol pode ser comparativamente mais fraca do que as afinidades dos azólicos lipofílicos a essas estruturas, o que justifica a presença de interações antagonistas ou indiferentes quando a anfotericina B é combinada simultaneamente a azólicos lipofílicos (itraconazol) e sinérgicas ou indiferentes quando combinada a azólicos hidrofílicos (fluconazol). Já quando os azólicos são administrados antes do poliênico, antagonismo é freqüentemente observado (VIUDES et al, 2001). Por outro lado, quando utilizadas concentrações subinibitórias de anfotericina, a combinação com azólicos parece ser sinérgica. A concentrações maiores, novamente o antagonismo é observado (VAN DER AUWERA et al, 1986).

Quanto à suscetibilidade das espécies aos azólicos, Ghannoum et al (1995) observaram que a combinação de anfotericina B com fluconazol resultava em efeito aditivo contra *C. albicans* em uma grande variedade de concentrações dos fármacos. Lewis et al (2002) verificaram que, com exceção de *C. glabrata*, o antagonismo era observado em isolados sensíveis ou sensíveis dose-dependentes ao fluconazol; enquanto que, para *Candida krusei* e *C. albicans* resistentes ao fluconazol, não era observado efeito antagonista frente a essa combinação.

A utilização de diferentes métodos de detecção do tipo de interação entre os fármacos também parece influenciar os resultados. Sinergismo entre voriconazol e anfotericina B frente a *C. glabrata* ocorre raramente quando avaliado através de métodos clássicos como diluição em caldo e disco difusão. Entretanto, utilizando ensaios de curva de ação fungicida, o voriconazol combinado com anfotericina B resulta em indiferença ou até sinergismo (BARCHIESI et al, 2004).

Os dados *in vivo* são ainda mais contraditórios porque divergem quanto aos animais testados, os locais de infecção, graus de imunidade, as doses e a ordem de administração dos antifúngicos (SUGAR, 1991; SANATI et al, 1997; LOUIE et al, 1999a; LOUIE et al, 1999b). Apesar disso, um recente estudo clínico coordenado por Rex et al (2003), comparando a administração de fluconazol e a administração da combinação de fluconazol com anfotericina B no tratamento de candidemia, mostrou elevação do número de sucessos terapêuticos utilizando a associação do triazólico com o poliênico.

Uma vez que as alilaminas e os agentes triazólicos inibem diferentes etapas da rota biossintética do ergosterol, a associação dessas classes de fármacos tem sido apontada como uma opção terapêutica bastante promissora principalmente no tratamento de candidíases refratárias ao fluconazol (GHANNOUM & ELEWSKY, 1999). Estudos *in vitro* utilizando a associação de terbinafina e azólicos demonstram excelente atividade sinergista entre os agentes frente a maioria das amostras de *Candida* com reduzida sensibilidade aos azólicos (BARCHIESI et al, 1997; BARCHIESI et al, 1998; PEREA et al, 2002b).

Perea et al (2002b) verificaram que a combinação que resultou em maior número de interações sinergistas foi terbinafina e voriconazol. Utilizando isolados de *C. albicans* de pacientes infectados com o vírus HIV, Weig & Muller (2001) ainda constataram que o sinergismo era mais proeminente em isolados resistentes ao voriconazol do que em amostras sensíveis a este mesmo antifúngico.

Barchiesi et al (1997) observaram sinergismo em 40% das interações terbinafina-fluconazol e em 43% das interações terbinafina-itraconazol frente a isolados de *C. albicans* com suscetibilidade reduzida aos agentes azólicos. Além disso, o antagonismo não era observado.

Por sua vez, Cantón et al (2005) relataram que a combinação de fluconazol ou voriconazol com terbinafina resultava em sinergismo frente a *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, e indiferença para *C. krusei* pelos métodos de “checkerboard” e Etest. Entretanto, pelo estudo de curva de morte, as interações eram indiferentes. Os três métodos avaliados mostraram boa correlação para a maioria das espécies, embora pelo método de checkerboard o efeito sinérgico tivesse sido mais intenso.

Apesar dos excelentes resultados obtidos *in vitro*, o sucesso no uso clínico da combinação de terbinafina e fluconazol no tratamento de pacientes com candidíase orofaríngea refratária a azólico só foi descrito em 1999 por Ghannoum & Elewsky.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Comparar o comportamento fenotípico e a suscetibilidade a antifúngicos entre isolados de *Candida dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Induzir a resistência ao fluconazol em isolados de *C. dubliniensis*;
- 3.2.2 Verificar a suscetibilidade de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol frente a itraconazol, voriconazol, ravuconazol, 5-fluorocitosina, caspofungina, terbinafina, cetoconazol e miconazol;
- 3.2.3 Avaliar a atividade das associações de anfotericina B e azólicos (itraconazol e voriconazol) em *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol;
- 3.2.4 Avaliar a atividade das associações de terbinafina e azólicos (itraconazol e voriconazol) em *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol;
- 3.2.5 Comparar as características fenotípicas de *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol em Ágar Suco de Tomate (V8), Ágar Níger, Ágar Alecrim, Ágar Gergelim e Ágar DRBC;
- 3.2.6 Comparar as características fenotípicas de *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol quanto ao crescimento em caldo Sabouraud hipertônico (NaCl 6,5%), assimilação de xilose, Tween 80 e α -metil-D-glicosídeo, e crescimento a 45°C;
- 3.2.7 Comparar a suscetibilidade de *C. albicans* e *C. dubliniensis* às toxinas “killer”;
- 3.2.8 Comparar as atividades de proteinases de *C. albicans* sensíveis com *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol;

- 3.2.9 Avaliar os efeitos da microaerofilia, fluconazol a concentrações subinibitórias, e da combinação dessas condições sobre a atividade de proteinase de *C. albicans* sensíveis, *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol;
- 3.2.10 Avaliar a capacidade dos anti-retrovirais inibidores de proteases (nelfinavir, indinavir e ritonavir) em inibir as proteinases de *C. albicans* sensíveis, *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Foram utilizados trinta isolados de *C. dubliniensis* e trinta isolados de *C. albicans*, todos sensíveis ao fluconazol, pertencentes à coleção de fungos do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI). Incluiu-se também trinta isolados de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol, os quais foram obtidos pela técnica de indução de resistência *in vitro* proposta por Fekete-Forgács et al (2000).

Para a avaliação da suscetibilidade dos isolados frente ao Sistema “killer”, foram utilizadas espécies padrões produtoras de toxina “killer” pertencentes aos gêneros *Hansenula* e *Pichia* (CANDIDO et al, 1995) (Quadro 1).

Código	Cepa	Especificação
K1	<i>Hansenula sp</i>	Stumm 1034
K2	<i>Pichia sp</i>	Stumm 1035
K3	<i>Hansenula anomala</i>	UM Milano
K4	<i>Hansenula anomala</i>	CBS 5759
K5	<i>Hansenula anomala</i>	Ahearn UN 866
K6	<i>Hansenula californica</i>	Ahearn WC 40
K7	<i>Hansenula canadensis</i>	Ahearn WC 41
K8	<i>Hansenula dimmenae</i>	Ahearn WC 44
K9	<i>Hansenula mrakit</i>	Ahearn W1C 51

Quadro 1111: Cepas padrões produtoras de toxinas “killer” utilizadas no ensaio.

Excluído: 1

4.2 Agentes antifúngicos

Os antifúngicos, na forma de sais, foram obtidos de seus respectivos fabricantes. As soluções-estoques de fluconazol e 5-fluorocitosina foram preparadas em água destilada enquanto que as soluções de anfotericina B, caspofungina, cetoconazol, miconazol, ravuconazol, terbinafina e voriconazol requereram dimetilsulfóxido.

As diluições intermediárias foram realizadas em Caldo RPMI 1640 tamponado com MOPS de acordo com a técnica empregada.

4.3 Agentes anti-retrovirais

As matérias-primas de ritonavir, indinavir e nelfinavir foram obtidas de seus respectivos fabricantes. As soluções-estoques foram preparadas em metanol absoluto e as diluições intermediárias foram realizadas em tampão citrato de sódio 0,2M – HCl (pH 4,5).

4.4 Indução de resistência ao fluconazol *in vitro*

Seguindo a técnica proposta por Fekete-Forgács et al (2000), as culturas de *C. dubliniensis* sensíveis ao fluconazol foram semeadas em tubos contendo Caldo Sabouraud e incubadas a 30°C “overnight”. As concentrações das culturas foram, a seguir, padronizadas em novos cultivos com Caldo Sabouraud com base na turvação medida em espectrofotômetro para absorvância 0,1 a 640 nm. Os cultivos padronizados foram incubados a 30°C e, após 10 horas, foi acrescentado fluconazol resultando em uma concentração final de 8 µg/mL. Decorridas 14 horas de incubação, as células das culturas contendo fluconazol foram novamente transferidas para tubos contendo Caldo Sabouraud e fluconazol 8 µg/mL e, incubadas a 30°C sob agitação de 120 rpm, durante 24 horas. Este procedimento foi realizado por 3 vezes consecutivas.

Após a terceira incubação, as células foram transferidas para novos tubos contendo Caldo Sabouraud e fluconazol na concentração final de 8 µg/mL a fim de que se obtivesse, em espectrofotômetro, uma absorbância final de 0,1 a 640 nm. Depois de 10 horas de incubação, foi adicionado fluconazol suficiente para obtenção de 16 µg/mL de fluconazol. Os cultivos foram incubados a 30°C por 24 horas sob agitação. Os ensaios continuaram duplicando-se a concentração de fluconazol até que se atingisse 64 µg/mL. As células do cultivo final foram semeadas em Ágar Sabouraud.

4.5 Testes fenotípicos para a identificação de *Candida dubliniensis*

As culturas de *C. dubliniensis* foram semeadas na superfície dos seguintes meios de cultura: Ágar Níger, Ágar Alecrim, Ágar Gergelim, Ágar DRBC e Ágar Suco de Tomate (STAIB & MORSCHHAUSER, 1997; LORETO et al, 2006a; LORETO et al, 2006b; SCHEID et al, 2006; ALVES et al, 2006). Em seguida, foram incubadas a 25°C por 48 horas. Foram observados: aspecto macroscópico das colônias, morfologia colonial e bordos, com auxílio de lupa e microscópio óptico.

Para a avaliação de crescimento em caldo Sabouraud hipertônico (ALVES et al, 2002), foram preparadas suspensões em água destilada estéril de culturas de *C. dubliniensis*, as quais foram ajustadas por espectrofotômetro a 85% de transmitância a 530 nm. Aliquotas de 20 µL de cada inóculo foram transferidas para tubos contendo 1mL de Caldo Sabouraud acrescido de cloreto de sódio 6,5%, os quais foram incubados a 30°C por 96 horas. As culturas foram examinadas visualmente para a detecção do crescimento fúngico.

Para os testes de assimilação de xilose e α -metil-D-glicosídeo (SALKIN et al, 1998), inóculos correspondentes ao tubo 1,0 da escala Mac Farland foram preparados em 1 mL de água destilada estéril e transferidos para placas de Petri onde foram homogeneizados com 10 mL de Ágar Auxano (“pour-plate”) a aproximadamente 50°C. Após a solidificação do meio de cultura, pequenas quantidades de cada açúcar foram distribuídas na superfície do Ágar sendo as placas incubadas a 35°C por 4 dias. A leitura dos resultados considerou a presença de uma zona de crescimento opaca ao redor das fontes de carbono, semelhante à observada ao redor do ponto de aplicação de dextrose (controle-positivo).

Para o teste de assimilação de Tween 80, os inóculos foram preparados em água destilada estéril e ajustados de acordo com o tubo 3 da escala de Mac Farland. Volumes de 10 µL de cada inóculo foram depositados em pontos equidistantes na superfície do Ágar Tween 80. As placas inoculadas com no máximo cinco amostras, foram deixadas entreabertas em capela de fluxo laminar para evaporação da fase líquida dos inóculos e, a seguir, incubadas a 35°C por 48 horas. Nesse teste, as colônias de *C. albicans* formam um halo opaco ao redor da colônia, enquanto que as amostras de *C. dubliniensis* não apresentam este efeito.

Por último, foi avaliado o crescimento das culturas a 45°C, de acordo com a técnica de Pinjon et al (1998). Resumidamente, os isolados foram semeados em placas de Ágar Sabouraud que foram incubadas a 45°C. Após 48 horas, foi avaliada a presença ou ausência de crescimento de colônias.

4.6 Avaliação da atividade de proteinases extracelulares

De modo geral, a determinação da atividade de proteinase de *C. dubliniensis* foi realizada de acordo com o método de Lam et al (1991). Cultivos recentes em Ágar Sabouraud foram inoculados em PBS pH 7,2, lavados por centrifugação e ressuspensos em caldo “Yeast Carbon Base” acrescido de vitaminas, glicose e albumina bovina (BSA) na concentração de 1×10^7 células/mL (equivalente em espectrofotômetro a 38% de transmitância a 520 nm). Após 4 dias de incubação a 37°C em agitador a 140 rpm, 500 µL de cada cultura foram adicionados a 2 mL de tampão citrato de sódio 0,1M – albumina bovina 1% pH 3,6, homogeneizados por inversão e incubados por 30 min a 37°C em condições de aerobiose e microaerobiose. A reação foi finalizada pela adição de 1,0 mL de ácido tricloroacético 10% (TCA) a cada cultura. A amostra controle negativo do ensaio foi preparada com 500 µL de cultura e adição de TCA antes da adição da albumina. O conteúdo de cada tubo foi homogeneizado em vórtex, centrifugado por 20 min a 4000 rpm e a -4°C. O sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore 0,22 µm utilizando-se uma seringa. A absorbância do filtrado foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm utilizando como branco o controle negativo.

4.6.1 Atividade de proteinases frente a doses subinibitórias de fluconazol

Utilizando a mesma técnica, as culturas foram inoculadas em tubos contendo tampão de indução (citrato de sódio 0,1M – albumina bovina 1% pH 3,6) e fluconazol, de modo que a concentração final do azólico no meio fosse correspondente a 1/2 CIM da cepa testada, pré-determinada pelo ensaio 4.8. Os cultivos foram homogeneizados por inversão e incubados por 30 min a 37°C em condições de aerobiose e microaerobiose.

4.6.2 Atividade de proteinases extracelulares em meio contendo anti-retrovirais

A ação dos inibidores da protease sobre a atividade das proteinases foi avaliada em ensaio similar ao 4.6; todavia, as culturas inoculadas em tubos contendo tampão de indução foram avaliadas de modo que a concentração final de ritonavir, nelfinavir ou indinavir, nos tubos, fosse, respectivamente, de 11 µg/mL, 3,2 µg/mL e 10 µM.

4.6.3 Análise estatística

Foram utilizados testes paramétricos para comparar as médias de atividade de proteinase em unidades de absorvância. A comparação das médias de todas as condições, foi calculada pela análise da variância considerando duas entradas (experimento em blocos ao acaso) e aplicado o teste Tukey. Para comparar as médias de atividade de proteinase entre *C. dubliniensis* sensíveis e *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol, foi calculada a análise da variância considerando uma entrada (delineamento inteiramente casualizado) e aplicado o teste Tukey. O nível de significância adotado foi 0,05.

4.7 Avaliação da suscetibilidade às toxinas “killer”

As amostras de *C. dubliniensis* e *C. albicans* sensíveis ao fluconazol bem como as resistentes a este azólico foram biotipadas segundo o sistema “killer” proposto por Polonelli et al (1983). Cultivos recentes foram semeados em 10 mL de caldo extrato de levedura-peptona-dextrose (YEPD) pH 4,5 mantidos em agitador a 120 rpm, durante 18 horas, a 25°C. Após este período, 1 mL dos cultivos foi diluído em 10 mL de caldo YEPD e 1,0 mL dessa suspensão adicionado em 20 mL de Ágar YEPD pH 4,5 (contendo 0,003% de azul de metileno) resfriado a aproximadamente 50°C. Após vigorosa agitação, o meio inoculado foi vertido em placas de Petri e deixado solidificar. Cultivos recentes das 9 espécies padrões produtoras de toxinas “killer” (K1 a K9) foram, então, semeadas na superfície do meio, aplicando uma gota de suspensão de cada inóculo preparado em caldo YEPD, segundo a técnica de Candido et al (1995). As placas foram incubadas a 25°C por 72 horas. Foram consideradas sensíveis (+), as cepas de *C. dubliniensis* e *C. albicans* que evidenciaram um halo incolor e/ou zona de crescimento com colônias azuis, ao redor do ponto de inoculação das espécies “killer”. Os resultados foram codificados pelo sistema mnemônico proposto por Polonelli et al (1983), composto de 3 dígitos, representando cada um, a combinação dos resultados obtidos no conjunto de 3 espécies padrões, como apresentado no quadro 2.

Atividade do 1º tríplice				Atividade do 2º tríplice				Atividade do 3º tríplice			
Espécies “killer”				Espécies “killer”				Espécies “killer”			
K1	K2	K3	Código	K4	K5	K6	Código	K7	K8	K9	Código
+	+	+	1	+	+	+	1	+	+	+	1
+	+	-	2	+	+	-	2	+	+	-	2
+	-	+	3	+	-	+	3	+	-	+	3
-	+	+	4	-	+	+	4	-	+	+	4
+	-	-	5	+	-	-	5	+	-	-	5
-	+	-	6	-	+	-	6	-	+	-	6
-	-	+	7	-	-	+	7	-	-	+	7
-	-	-	8	-	-	-	8	-	-	-	8

Quadro 2222: Composição dos dígitos para a determinação dos biotipos “killer”, segundo POLONELLI et al (1983).

Excluído: 2

4.8 Testes de suscetibilidade aos antifúngicos

Foram realizados testes de suscetibilidade ao fluconazol para confirmar a sensibilidade ou resistência para todos os isolados através da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as normas de padronização publicadas no documento M27-A2 do atual CLSI (NCCLS, 2002).

A suspensão do inóculo foi preparada pelo método espectrofotométrico resultando em $(1,5 \pm 1,0) \times 10^3$ células por mL. Volumes de 100 μ L de cada inóculo foram depositados nos poços de placas de poliestireno com fundo chato já contendo igual volume do respectivo agente antifúngico. As concentrações finais dos antifúngicos foram de 0,007 a 1,0 μ g/mL para itraconazol; 0,125 a 8 μ g/mL para anfotericina B, caspofungina, ravuconazol e voriconazol; 0,03 a 4 μ g/mL para cetoconazol; 0,5 a 64 μ g/mL para fluconazol e 5-fluorocitosina; 0,06 a 8,0 μ g/mL para miconazol e terbinafina. As placas foram, então, incubadas a 35°C, e as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) determinadas após 48h de incubação. Após a incubação, as CIMs para 5-fluorocitosina, terbinafina e fármacos azólicos foram consideradas as menores concentrações dos fármacos que evidenciaram 50% de inibição em relação a turvação dos controles positivos; enquanto que para anfotericina B e caspofungina, as menores concentrações que evidenciaram 100% de inibição (NCCLS, 2002).

Os critérios de definição de suscetibilidade ao fluconazol, itraconazol, voriconazol e 5-fluorocitosina utilizados foram aqueles sugeridos pelo CLSI (NCCLS, 2002; CLSI, 2006). As CIMs utilizadas na definição de resistência de cetoconazol ($\geq 4,0$ μ g/mL), miconazol ($\geq 8,0$ μ g/mL), anfotericina B ($> 1,0$ μ g/mL), caspofungina ($> 2,0$ μ g/mL), ravuconazol ($\geq 2,0$ μ g/mL) e terbinafina ($>8,0$ μ g/mL) foram estabelecidas de acordo com estudos anteriores (KURIYAMA et al, 2005; COLIN et al, 1999; KROGH-MADSEN et al, 2006; PFALLER et al, 2004; RYDER et al, 1998).

Para análise estatística, foi aplicado o teste das Ordens Assinaladas de Wilcoxon para médias com dados emparelhados a fim de comparar as médias das CIMs dos isolados sensíveis e dos isolados resistentes. O nível de significância utilizado foi de 0,05.

4.9 Avaliação das associações de antifúngicos frente a *Candida dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol

A técnica de “checkerboard” (LEWIS et al, 2002) foi utilizada para avaliar os efeitos da associação de anfotericina B e terbinafina a azólicos (itraconazol e voriconazol) frente a isolados de *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol. As diluições de cada fármaco foram preparadas de modo que se obtivesse concentrações quatro vezes maiores do que as concentrações finais desejadas (1/16 a 4 x CIM de cada agente) porque volumes de 50 µL de cada concentração de azólicos foram combinados com outros 50 µL de cada diluição de anfotericina B ou terbinafina; a este volume foi somado 100 µL de inoculo em caldo RPMI 1640 que foram depositados em cada poço da microplaca. A preparação dos inóculos, tempo e temperatura de incubação foram similares aos descritos nos testes de suscetibilidade (4.8).

Para avaliar a interação entre os fármacos, a concentração inibitória fracionária (CIF) foi calculada para cada combinação. As CIFs foram calculadas para cada agente pela divisão da concentração inibitória de cada fármaco isolado pela concentração inibitória obtida pela associação. Os valores de CIF foram então somados para definir o índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) resultante da combinação. Sinergismo foi definido como $ICIF \leq 0,5$. A atividade aditiva, no intervalo de $0,5 < ICIF < 1,0$. A indiferença foi considerada quando $1,0 < ICIF < 4,0$, enquanto que antagonismo foi definido quando $ICIF \geq 4,0$.

5 RESULTADOS

Com o propósito de investigar as alterações na suscetibilidade a outros antifúngicos, fatores de virulência e características fenotípicas resultantes da indução da resistência ao fluconazol *in vitro*, isolados resistentes foram gerados a partir de isolados de *C. dubliniensis* sensíveis ao fluconazol.

5.1 Indução de resistência ao fluconazol *in vitro*

Quinze dias de crescente exposição ao fluconazol foram necessários para que os isolados de *C. dubliniensis* exibissem concentrações inibitórias mínimas iguais ou superiores a 64 µg/mL frente ao azólico. Os resultados do teste de suscetibilidade ao fluconazol estão ilustrados na Tabela 1 e demonstram que os derivados resistentes, obtidos através da técnica de indução de resistência *in vitro*, tornaram-se cerca de 700 vezes menos suscetíveis ao fluconazol do que os isolados sensíveis originais.

Tabela 1111: Suscetibilidade (µg/mL) *in vitro* dos isolados de *C. dubliniensis* frente ao fluconazol antes (FS) e após (FR) os 15 dias de crescente exposição ao azólico.

Excluído: 1

Grupos de isolados	Média geométrica	Intervalo	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Índice de significância
FS (n=30)	0,2145	0,06-0,50	0,125	0,5	p < 0,001
FR (n=30)	151,47	64 – 256	128	256	

CIM₅₀ = Concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% dos isolados do grupo testado;

CIM₉₀ = Concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% dos isolados do grupo testado.

5.2 Testes fenotípicos para a identificação de *C. dubliniensis*

Os testes fenotípicos utilizados na identificação presuntiva de *C. dubliniensis* foram empregados para verificar a manutenção das características fenotípicas dos isolados após

exposição prolongada ao fluconazol. A Tabela 2 indica os testes realizados e a porcentagem de isolados com resultados positivos para a espécie.

Tabela 2222: Comparação das características fenotípicas de *C. dubliniensis* sensíveis (FS) e resistentes (FR) ao fluconazol.

Excluído: 2

	ALEC	GERG	NIG	DRBC	V8	45°C	SABh	Tween	XIL	MDG
Grupo FS (n=30)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Grupo FR (n=30)	76,66%	0%	0%	76,66%	100%	100%	100%	100%	100%	76,66%

Produção de clamidoconídios em Ágar Alecrim (ALEC), Ágar Gergelim (GERG), Ágar Níger (NIG), Ágar DRBC e Ágar Suco de Tomate; crescimento negativo em Ágar Sabouraud a 45°C, em Caldo Sabouraud contendo 6,5% de NaCl (SABh); ausência de halo opaco em meio contendo Tween 80; e assimilação negativa de xilose (XIL) e α -metil-D-glicosídeo (MDG) em Ágar Auxano.

O exame microscópico dos cultivos permitiu observar que, antes da exposição ao fluconazol (FS), 100% dos isolados de *Candida dubliniensis* evidenciavam colônias com bordos rugosos e clamidoconídios em todos os meios de cultura testados, sob temperatura ambiente. Após a indução de resistência ao fluconazol, entretanto, apenas o Ágar Suco de Tomate permitiu a identificação dessas estruturas em 100% dos isolados. Quando semeados em Ágar Alecrim e Ágar DRBC, 76,66% dos cultivos apresentaram as características da espécie, enquanto que Ágar Níger e Ágar Gergelim apenas permitiram a visualização de colônias com bordos lisos sem clamidoconídios.

Por outro lado, os testes fenotípicos baseados na incapacidade de crescimento em Ágar Sabouraud a 45°C ou em Caldo Sabouraud Hipertônico após 96 horas permitiram a identificação de 100% dos isolados de *C. dubliniensis*, tanto sensíveis quanto resistentes ao fluconazol. Os testes de assimilação de xilose e atividade lipolítica em Ágar Tween 80 também se mostraram bastante úteis na confirmação da espécie após a exposição ao fluconazol.

5.3 Avaliação da atividade das proteinases extracelulares

Foram comparados os efeitos de diferentes condições de incubação e influência de anti-retrovirais inibidores de protease na atividade de proteinases extracelulares de 3 grupos de isolados: 30 isolados clínicos de *C. albicans* sensíveis ao fluconazol, 30 isolados clínicos

de *C. dubliniensis* sensíveis ao fluconazol e 30 derivados de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol. As condições testadas foram: incubação sob pressão parcial de CO₂, adição de fluconazol a concentrações subinibitórias, incubação sob pressão parcial de CO₂ combinada à adição de fluconazol a concentrações subinibitórias, e exposição aos anti-retrovirais nelfinavir, indinavir e ritonavir. Os resultados estão indicados na Tabela 3.

Tabela 3333: Comparação das atividades de proteinase (em unidades de absorvância) de *C. albicans* (FS) e *C. dubliniensis* (FS e FR) sob diferentes condições de incubação.

Excluído: 3

Isolados	Condições de exposição						
	Controle	I	II	III	IV	V	VI
<i>C. dubliniensis</i> (FS)	0,09697 a	0,12177	0,10353	0,12840	0,13817	0,14270	0,13407
<i>C. dubliniensis</i> (FR)	0,10767 a	0,12313	0,12443	0,12863	0,13537	0,12687	0,14260
<i>C. albicans</i> (FS)	0,17273 b	0,11263	0,10353	0,12840	0,15720	0,12083	0,11310

Microaerofilia (I), concentrações subinibitórias de fluconazol (II), combinação de microaerofilia com concentrações subinibitórias de fluconazol (III), e exposição aos anti-retrovirais inibidores de protease nelfinavir (IV), indinavir (V) e ritonavir (VI). Médias com letras diferentes indicam diferenças significativas em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quando comparadas as atividades de proteinase entre as espécies, diferenças significativas entre *C. dubliniensis* e *C. albicans* foram encontradas. Os isolados de *C. dubliniensis* sensíveis ao fluconazol evidenciaram uma atividade proteinásica quase que duas vezes menor em relação à atividade da enzima hidrolítica em *C. albicans*. No entanto, quando comparadas as atividades das enzimas entre os grupos de isolados de *C. dubliniensis* sensíveis (FS) e resistentes (FR) ao fluconazol, não houve diferença significativa. Frente às diferentes condições de incubação, a análise da variância também não evidenciou diferenças significativas entre as médias para cada um dos grupos.

5.4 Avaliação da suscetibilidade às toxinas “killer”

A suscetibilidade ao sistema “killer” permitiu diferenciar pelo menos 21 biotipos entre os isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* testados (Tabela 4). O biotipo 211 foi o mais frequentemente identificado em ambas as espécies. Os modelos 111, 611 e 211 representaram cerca de 50% dos 14 biotipos identificados entre as 30 amostras de *C. albicans* analisadas, enquanto que os mesmos modelos em *C. dubliniensis* representaram cerca de 67% dos 11

biotipos identificados para a espécie. Apenas um isolado de cada espécie não foi sensível a pelo menos uma cepa “killer”, e pelo menos dois isolados de cada espécie evidenciaram sensibilidade a todas as toxinas produzidas pelas cepas padrões.

A suscetibilidade dos isolados de *C. albicans* às cepas produtoras de toxinas “killer” variou entre 33,33% e 93,33% (Tabela 5). Entretanto, frente aos isolados de *C. dubliniensis*, a atividade das cepas “killer” variou de 6,67% a 93,33%. As cepas padrões com maior atividade frente aos dois grupos de isolados foram *Pichia sp* (K2) e *Hansenula mrakit* (K9), enquanto que a cepa menos ativa foi a *Hansenula anomala* (K3). Exceto pela *Hansenula anomala* (K3), as demais cepas “killer” evidenciaram atividades semelhantes frente às duas espécies.

Tabela 4444: Biotipos de suscetibilidade dos isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* frente às toxinas “killer”

Excluído: 4

Isolados	Biotipos (%)							
	111	211	241	271	411	611	641	Outros
<i>C. albicans</i>	13,33	26,67	0	0	6,67	10	13,33	20
<i>C. dubliniensis</i>	6,67	43,33	6,67	6,67	0	16,67	0	30

Tabela 5555: Percentuais de suscetibilidade dos isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* às toxinas “killer” produzidas por 9 cepas padrões.

Excluído: 5

Código	Cepa padrão	Suscetibilidade (%)	
		<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
K1	<i>Hansenula sp</i>	50,00	70,00
K2	<i>Pichia sp</i>	90,00	90,00
K3	<i>Hansenula anomala</i>	33,33	6,67
K4	<i>Hansenula anomala</i>	73,33	80,00
K5	<i>Hansenula anomala</i>	86,67	83,33
K6	<i>Hansenula californica</i>	93,33	93,33
K7	<i>Hansenula canadensis</i>	76,67	86,67
K8	<i>Hansenula dimmenae</i>	83,33	93,33
K9	<i>Hansenula mrakit</i>	90,00	90,00

5.5 Testes de suscetibilidade aos antifúngicos

As concentrações inibitórias mínimas dos isolados de *C. dubliniensis* frente a todos os agentes antifúngicos foram determinadas antes e depois dos 15 dias de exposição crescente ao fluconazol. A Tabela 6 apresenta os resultados dos testes de suscetibilidade antifúngica que permitem comparações mais detalhadas entre os grupos.

Tabela 6666: Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) *in vitro* dos isolados de *C. dubliniensis* aos agentes antifúngicos antes (FS) e depois (FR) dos 15 dias de crescente exposição ao fluconazol.

Excluído: 6

Antifúngicos	Grupo de isolados	Média geométrica	Intervalo	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Índice de significância
Anfotericina B	FS	0,207	0,060 – 0,50	0,250	0,500	p < 0,001
	FR	0,912	0,250 – 2,00	1,000	2,000	
Caspofungina	FS	0,177	0,125 – 4,00	0,125	0,250	p = 0,001
	FR	0,388	0,250 – 8,00	0,250	1,000	
Cetoconazol	FS	0,033	0,030 – 0,25	0,030	0,030	p < 0,001
	FR	5,157	2,000 – 8,00	4,000	8,000	
5-fluorocitosina	FS	0,131	0,125 – 0,25	0,030	0,125	p = 1,0
	FR	0,131	0,125 – 0,25	128,0	128,0	
Itraconazol	FS	0,033	0,008 – 0,25	0,125	0,500	p < 0,001
	FR	111,4	32,00 – 512	4,000	8,000	
Miconazol	FS	0,104	0,030 – 8,00	0,004	0,060	p < 0,001
	FR	3,325	1,000 – 8,00	2,000	4,000	
Ravuconazol	FS	0,157	0,125 – 4,00	0,125	0,125	p < 0,001
	FR	6,805	1,000 – 16,0	0,125	0,125	
Terbinafina	FS	0,771	0,060 – 16,0	0,125	0,250	p < 0,001
	FR	157,6	64,00 – 256	8,000	16,00	
Voriconazol	FS	0,006	0,001 – 0,125	1,000	4,000	p < 0,001
	FR	2,047	0,250 – 16,0	128,0	256,0	

CIM₅₀ = Concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% dos isolados do grupo testado;

CIM₉₀ = Concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% dos isolados do grupo testado.

Entre os isolados de *C. dubliniensis* sensíveis ao fluconazol, a uma concentração de 0,125 $\mu\text{g/mL}$, o voriconazol foi o antifúngico mais ativo, evidenciando 100% de inibição de crescimento dos isolados. O cetoconazol foi o segundo, inibindo 97% dos isolados, seguido pelo itraconazol (93%) e flucitosina (93%). No grupo dos isolados resistentes (FR), a mesma concentração foi inibitória somente quando foi utilizada a 5-fluorocitosina.

A maior variação entre os grupos FS e FR ocorreu nos testes com cetoconazol ($Z = -4,905$; $p < 0,001$), seguido de ravuconazol ($Z = -4,846$; $p < 0,001$) e terbinafina ($Z = -4,788$; $p < 0,001$), enquanto que a menor foi observada com caspofungina ($Z = -3,273$; $p < 0,001$).

Excetuando-se a 5-fluorocitosina, quando a resistência ao fluconazol foi induzida, houve uma evidência de decréscimo na suscetibilidade do grupo FR frente aos demais antifúngicos, em um nível de significância de 5%. A resistência cruzada foi detectada com cetoconazol, itraconazol, ravuconazol e terbinafina.

Entre os azólicos, os maiores níveis de resistência cruzada foram observados frente ao itraconazol (100%), seguido de cetoconazol (96,66%) e ravuconazol (90%). Entre os não-azólicos, foi observado que 100% dos derivados resistentes ao fluconazol demonstraram resistência cruzada com terbinafina; enquanto que 23,33% com anfotericina B e 3,33% com caspofungina.

5.6 Avaliação das associações de antifúngicos frente a *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol

As combinações de terbinafina, anfotericina B, itraconazol e voriconazol foram testadas frente aos grupos FS e FR, através da técnica de “checkerboard”. As concentrações inibitórias mínimas foram avaliadas após o período de incubação de 48h e estão indicadas na Tabela 7. A maioria das combinações evidenciou atividade indiferente frente aos isolados de *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol. Quando as interações foram avaliadas individualmente (Tabela 8), aproximadamente 67% dos isolados FS apresentaram interação antagonista para a combinação de terbinafina com itraconazol. Por outro lado, quando considerado o grupo FR, o antagonismo foi observado somente em 20% dos isolados para a mesma combinação. Ainda, o sinergismo da combinação de terbinafina com itraconazol cresceu de 3,33% no grupo FS para 30% no grupo FR. Terbinafina associada a voriconazol evidenciou as mesmas porcentagens de sinergismo e indiferença entre os isolados do grupo sensível ao fluconazol; no grupo resistente, a indiferença pareceu ser a interação mais freqüente (53,33%) e o sinergismo caiu para zero. A anfotericina B associada ao itraconazol evidenciou cerca de 20% de antagonismo nos dois grupos. O efeito aditivo foi mais predominante no grupo resistente ao fluconazol (FR) do que no grupo sensível (FS). Entre os isolados do grupo FS, a combinação de anfotericina B e voriconazol evidenciou principalmente antagonismo (46,67%), enquanto que entre os isolados do grupo FR, o efeito mais predominante foi o aditivo (60%).

Tabela 7777: Interações das combinações de antifúngicos *in vitro* frente a *C. dubliniensis* sensíveis (FS) e resistentes (FR) ao fluconazol, utilizando a técnica de “checkerboard”.

Excluído: 7

Antifúngicos	Grupos de isolados	CIM (µg/mL) de cada antifúngico		CIF (µg/mL) _a	ICIF _b	Resultado
		Na combinação	Sem combinação			
Terbinafina Itraconazol	FS	2,64 0,04	0,77 0,03	3,42 0,75	4,17	Antagonismo
	FR	54,44 70,20	157,6 111,43	0,34 0,63		
Terbinafina Voriconazol	FS	1,44 0,01	0,77 0,01	1,87 1,00	2,87	Indiferença
	FR	90,51 1,70	157,6 2,05	0,57 0,83		
Anfotericina B Itraconazol	FS	0,08 0,03	0,21 0,03	0,38 1,00	1,38	Indiferença
	FR	0,19 111,43	0,91 111,43	0,21 1,00		
Anfotericina B Voriconazol	FS	0,01 0,01	0,21 0,01	0,05 1,00	1,05	Indiferença
	FR	0,16 2,52	0,91 2,05	0,18 1,23		

a Divisão da CIM do antifúngico na combinação pela CIM do antifúngico sozinho.

b ICIF é a soma das CIFs dos antifúngicos em combinação.

Tabela 8888: Percentuais de sinergismo, aditividade, indiferença e antagonismo resultantes das combinações de terbinafina, anfotericina B, itraconazol e voriconazol frente a *Candida dubliniensis* sensíveis (FS) e resistentes (FR) ao fluconazol.

Excluído: 8

Antifúngicos	Grupos de isolados	Interações (%)			
		Sinergismo	Aditividade	Indiferença	Antagonismo
Terbinafina Itraconazol	FS	3,33	3,33	26,66	66,66
Terbinafina Voriconazol	FR	30	13,33	36,66	20
Terbinafina Voriconazol	FS	16,66	10	16,66	56,67
Voriconazol	FR	0	23,33	53,33	23,33
Anfotericina B Itraconazol	FS	16,66	20	40	23,33
Itraconazol	FR	13,33	10	56,67	20
Anfotericina B Voriconazol	FS	6,66	16,66	30	46,67
Voriconazol	FR	6,66	60	23,33	6,66

6 DISCUSSÃO

Apesar de sua baixa prevalência, *C. dubliniensis* tem merecido maior atenção dos pesquisadores porque compartilha similaridades fenotípicas e genotípicas com *C. albicans*, a espécie mais frequentemente isolada nas infecções causadas pelo gênero *Candida*. Entretanto, mais do que isso, a espécie assume importância por causa de sua habilidade de facilmente desenvolver resistência ao fluconazol.

A resistência ao fluconazol em *C. dubliniensis* foi descrita pela primeira vez por Moran et al (1997) em um grupo de isolados clínicos coletados de pacientes com AIDS ou HIV positivo. Os mesmos autores ainda demonstraram que derivados resistentes ao fluconazol poderiam ser gerados a partir de isolados sensíveis após exposição *in vitro* ao azólico, sugerindo que esse microrganismo possui um mecanismo de resistência rapidamente indutível. A resistência aos azólicos em isolados clínicos de *C. dubliniensis* foi ainda descrita por outros autores, e assim como em *C. albicans*, o fenômeno está primariamente associado com isolados de pacientes infectados pelo HIV, como resultado de tratamento prolongado com fluconazol (RUHNKE et al, 2000; MARTINEZ et al, 2002; PEREA et al, 2002).

6.1 Indução de resistência ao fluconazol *in vitro* e a identificação fenotípica dos isolados de *C. dubliniensis*

C. dubliniensis e *C. albicans* são fenotipicamente similares. Ambas produzem tubos germinativos e clamidoconídios, características anteriormente exclusivas de *C. albicans* (SULLIVAN et al, 1995). Embora as técnicas genotípicas, como o RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), PCR (“Polymerase Chain Reaction”) ou sequenciamento da região V3 do gene que codifica o RNA ribossômico, sejam bastante rigorosas e precisas, diversos ensaios fenotípicos têm sido propostos a fim de tornar a identificação de *C. dubliniensis* mais econômica (GALES et al, 1999; KIRKPATRICK et al, 1998; SULLIVAN et al, 1995; SULLIVAN et al, 1998).

O teste de temperatura diferencial é provavelmente a ferramenta mais simples e menos dispendiosa para a identificação de isolados de *C. dubliniensis*. Essa espécie não exibe crescimento ou ele é sofrível a 45°C, enquanto que *C. albicans* cresce bem nesta temperatura (PINJON ET AL, 1998). Já as técnicas envolvendo perfil de assimilação de açúcares ou a formação de clamidoconídios evidenciam pequeno poder discriminatório entre as espécies, uma vez que significantes variações entre as cepas de mesma espécie são observadas (TINTELNOT et al, 2000). Finalmente, além do alto custo, o teste da atividade da β -D-glicosidase, evidencia um baixo valor preditivo (ODDS et al, 1998; TINTELNOT et al, 2000). Por estas razões, no presente trabalho, optou-se por utilizar diferentes técnicas fenotípicas, que, em conjunto, permitissem, com segurança e baixo custo, verificar as características da espécie, após a exposição ao fluconazol.

Já foi demonstrado que longas exposições a concentrações subinibitórias de fluconazol afetam a ultra-estrutura das células de *C. albicans* pelo aumento da porosidade da membrana celular (HAZEN et al, 2000). Por esse motivo, desconhecia-se se em *C. dubliniensis* alterações estruturais, como o aspecto das colônias e a formação de clamidoconídios, poderiam, ainda, ser detectadas após prolongada exposição a este azólico. Anteriormente à indução de resistência, todos os isolados de *C. dubliniensis* podiam ser identificados através da pesquisa de clamidoconídios em meios de cultura como Ágar Alecrim, Ágar DRBC, Ágar Níger, Ágar Gergelim e Ágar Suco de Tomate; após o experimento, apenas o último permitiu a identificação das estruturas características da espécie em todos os isolados testados. Por outro lado, a resistência ao fluconazol não causou interferências nas características da espécie nos testes de temperatura, crescimento em meio hipertônico, assimilação de açúcar e atividade lipolítica em Ágar Tween 80, o que contribuiu para que esses testes fossem considerados importantes ferramentas na confirmação fenotípica de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol.

6.2 Avaliação da atividade das proteinases extracelulares

A patogenicidade das espécies de *Candida* está relacionada a uma combinação de fatores que contribuem para a sua virulência. Entre esses fatores, as proteinases extracelulares têm sido amplamente estudadas.

A metodologia mais tradicionalmente empregada para avaliação da atividade de proteinase em *C. albicans* e *C. dubliniensis* consiste da medição do halo transparente ou opaco ao redor da colônia em placa contendo ágar albumina bovina. No entanto, enquanto que a produção de proteinase era encontrada em 100% dos isolados de *C. dubliniensis* (VIDOTTO et al, 2004), outros autores apenas a encontravam em 10% dos isolados testados (HANNULA et al, 2000) ou mesmo não a conseguiam detectar (FOTEDAR & AL-HEDAITHY, 2005). Desse modo, as diferenças observadas quanto à produção da enzima podem estar atribuídas às variações genotípicas das cepas, ou ainda à origem das amostras (FOTEDAR & AL-HEDAITHY, 2005).

A técnica espectrofotométrica, utilizada neste estudo, permitiu a detecção da atividade de proteinase em todos os isolados testados. Os resultados obtidos evidenciaram que a atividade da enzima foi significativamente maior nos isolados de *C. albicans* do que em *C. dubliniensis*. Tal observação concorda com os dados publicados por Linares et al (2007) e complementa os resultados de estudos de aderência, formação de hifas e patogenicidade em camundongos, que indicam a menor virulência de *C. dubliniensis* em relação à *C. albicans* (VILELA et al, 2002; BORG-VON ZEPPELIN et al, 2002; STOKES et al, 2007).

Também, não houve diferença significativa entre a atividade de proteinase quando comparou-se *C. dubliniensis* sensíveis com as cepas da mesma espécie que eram resistentes ao fluconazol. Assim, a resistência ao fluconazol pareceu não interferir na atividade da enzima, contrariamente ao evidenciado por *C. albicans* em estudos anteriores (FEKETE-FORGÁCS et al, 2000; WU et al, 2000; BORG-VON ZEPPELIN et al, 2002). A resistência ao fluconazol, em isolados de *C. albicans*, além de estimular a germinação, aderência, produção de proteinases e fosfolipases *in vitro*, proporciona um substancial aumento da virulência, quando esses isolados são inoculados em camundongos (FEKETE-FORGÁCS et al, 2000; WU et al, 2000; BORG-VON ZEPPELIN et al, 2002).

A exposição a concentrações subinibitórias de fluconazol *in vitro* não somente resulta na seleção de derivados com reduzida sensibilidade, mas também estimula a aderência de *C. dubliniensis* às células epiteliais e a secreção de proteinase pelas células (BORG-VON ZEPELIN et al, 2002). Do mesmo modo, já foi constatado que o aumento na atividade de proteinase pelos isolados cultivados sob concentrações subinibitórias de fluconazol corresponde ao aumento no desenvolvimento de resistência a este fármaco (WU et al, 2000). No presente estudo, as concentrações subinibitórias de fluconazol não interferiram significativamente na atividade de proteinase dos isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao azólico. Esse resultado vai de encontro aos obtidos por Copping et al (2005) e Wu et al (2000), que detectaram ações contraditórias do azólico sobre a atividade de proteinase de *C. albicans* sensíveis ao fluconazol. Portanto, os resultados aqui obtidos não conseguiram confirmar qualquer relação geral entre a suscetibilidade ao fluconazol e a expressão da atividade de proteinase relacionada ao azólico em *C. albicans*, com base no teste estatístico de Tukey.

Nos últimos anos, a introdução dos agentes anti-retrovirais inibidores de protease no tratamento de pacientes HIV positivo, além de retardar o aparecimento dos sintomas da AIDS, pareceu acarretar uma redução na incidência de infecções fúngicas, especialmente candidíases orais. Embora a proteinase viral tenha uma função altamente específica na replicação e, conseqüentemente, na infecção pelo vírus HIV, vários estudos indicaram que a atividade das proteinases em *C. albicans* era reduzida pela crescente utilização da terapêutica anti-HIV, que inclui inibidores de protease e transcriptase reversa (MUNRO & HUBE, 2002).

Diversos estudos fornecem evidências para um efeito direto dos inibidores da protease viral na atividade proteinásica de *C. albicans*. Os anti-retrovirais inibidores da protease inibem parcialmente a atividade das proteinases, mas também atuam reduzindo a taxa de crescimento fúngico (KORTING et al, 1999; SCHALLER et al 2003; BLANCO et al, 2003).

Quando a atividade de proteinase é relacionada à aderência das células fúngicas às células epiteliais do hospedeiro, o ritonavir, que é considerado o inibidor mais ativo, diminui a aderência de *C. albicans* por mais de 70% em relação aos controles. Ao contrário deste, o indinavir, que é mais solúvel em água, parece não afetar a aderência de *C. albicans* nas células epiteliais, enquanto que o nelfinavir parece induzir o seu aumento sob as mesmas condições (BORG-VON ZEPELIN et al, 1999).

No presente estudo, não ficou significativamente comprovada a redução da atividade de proteinase pela introdução de nelfinavir, indinavir e ritonavir no meio de indução da enzima nos isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Embora nenhum estudo avaliando a atividade de proteinase de *C. dubliniensis* frente a esses fármacos tivesse sido realizado até então, a ausência de interferência dos anti-retrovirais na atividade da enzima é um fato inusitado, uma vez que em *C. albicans* tem sido observada a inibição desta atividade (BORG-VON ZEPPELIN et al, 1999; BLANCO et al, 2003; GRUBER et al, 1999; KORTING et al, 1999).

6.3 Avaliação da suscetibilidade às toxinas “killer”

Desde a década de 80, o fenômeno “killer” tem se constituído em um método simples, sensível e reprodutível, utilizado na diferenciação de cepas de *C. albicans* como um marcador epidemiológico, principalmente em casos de infecções nosocomiais (POLONELLI et al, 1983; CANDIDO et al, 1995; OLIVEIRA et al, 1998; BUZZINI & MARTINI, 2001). Em um grupo de 100 isolados de *C. albicans*, Polonelli et al (1983) identificaram 25 biotipos, sendo que os mais frequentes foram: 111 (52%), 113 (4%), 123 (4%), 525 (4%), 725 (4%) e 811 (4%). No estudo de Candido et al (1995), os modelos 211 (47,3%), 111 (22,6%) e 811 (10,3%) representaram 80,2% dos 23 biotipos identificados entre as 146 cepas de *C. albicans* analisadas, enquanto que Oliveira et al (1998) observaram que 95,8% dos 24 isolados estudados mostraram-se resistentes às toxinas K1, K2 e K3 (biotipo 811).

Recentemente, Silva et al (2007) analisaram a sensibilidade de um grupo de nove isolados de *C. dubliniensis* provenientes de pacientes HIV positivo frente às toxinas produzidas pelo mesmo grupo de cepas “killer”. Apenas dois biotipos foram observados, 688 e 888, e somente uma cepa foi sensível à toxina K2.

No presente estudo, o biotipo 211 foi o mais frequentemente identificado tanto no grupo de *C. albicans* quanto no grupo de *C. dubliniensis*. Os modelos 111, 611 e 211 representaram cerca de 50% dos 14 biotipos identificados entre as 30 amostras de *C. albicans* analisadas, enquanto que os mesmos modelos em *C. dubliniensis* representaram cerca de 67% dos 11 biotipos identificados para a espécie.

De modo geral, as duas espécies não puderam ser diferenciadas pela sua suscetibilidade ao sistema “killer”, uma vez que apresentaram biotipos semelhantes e sensibilidade a pelo menos uma das cepas produtoras de toxinas. Por outro lado, novos estudos podem ser realizados, utilizando diferentes cepas “killer”. Buzzini & Martini (2001), utilizando as cepas *Candida maltosa* G7A, *Debaryomyces hansenii* P41 e *Williopsis saturnus* DBVPG 3127 e DBVPG 3671, conseguiram discriminar isolados de *C. albicans* de isolados pertencentes a espécies não-*albicans*. Enquanto que isolados de *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* evidenciaram sensibilidade a apenas uma toxina, nenhuma atividade “killer” frente a um grupo de 91 isolados de *C. albicans* havia sido detectada.

6.4 Testes de suscetibilidade aos antifúngicos

Diversos mecanismos de resistência aos azólicos têm sido demonstrados para *C. dubliniensis*. Tanto mutações afetando a afinidade da enzima-alvo 14- α -demetilase, quanto as modificações na rota biossintética do ergosterol, como os defeitos na etapa de $\Delta 5,6$ -dessaturação do esterol que evita a acumulação do metabólito tóxico 14- α -metil-3,6-diol, foram descritas (PEREA et al, 2002; PINJON et al, 2003), e parecem afetar a suscetibilidade a todos os agentes antifúngicos. Entretanto, a resistência parece estar associada em grande parte com a superexpressão de dois tipos de transportadores: os transportadores ABC (“ATP-binding cassette”) Cdr1p e Cdr2p, respectivamente codificados pelos genes CdCDR1 e CdCDR2, e as proteínas facilitadoras Mdr1, codificadas pelo gene CdMDR1. A proteína Mdr1p pode transportar somente fluconazol e foi demonstrado que é o mecanismo primário de resistência ao fluconazol em *C. dubliniensis* (MORAN et al, 1998; WIRSCHING et al, 2001). Por outro lado, Cdr1p e Cdr2p podem transportar uma grande variedade de azólicos, incluindo itraconazol e cetoconazol. A hiperregulação do gene CdCDR1 foi observada em isolados de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol, e parece ser importante na mediação da redução de suscetibilidade ao itraconazol e cetoconazol, mas não é essencial para a resistência ao fluconazol (MORAN et al, 2002).

Considerando os mecanismos de resistência aos azólicos, é esperado encontrar resistência cruzada entre os mesmos quando são realizados testes de suscetibilidade aos antifúngicos em isolados resistentes ao fluconazol (QUINDÓS et al, 2000; ALVES et al, 2006b). Com o intuito de avaliar a resistência cruzada de *C. dubliniensis* aos antifúngicos mais modernos, a resistência ao fluconazol foi induzida. No presente estudo, os resultados mostraram que, no grupo de isolados resistentes, a resistência cruzada ocorre entre cetoconazol, itraconazol e ravuconazol, e também com terbinafina. Apesar de a resistência cruzada não ter sido detectada em isolados clínicos de *C. dubliniensis* na maior parte dos estudos anteriores (MORAN et al, 1997; KIRKPATRICK et al, 1998; PFALLER et al, 1999), estes resultados estão de acordo com aqueles descritos por Quindós et al (2000), onde, em um grupo de 30 isolados, foram encontrados quatro isolados de *C. dubliniensis* que eram resistentes ao fluconazol e ao cetoconazol. Ainda dentro desse grupo, três isolados apresentaram resistência ao itraconazol, mas todos foram sensíveis à anfotericina B e ao voriconazol. A resistência cruzada entre fluconazol e terbinafina havia sido descrita somente em *C. albicans* (KOHLI et al, 2002). Já, entre fluconazol e ravuconazol, a resistência cruzada tinha somente sido detectada por Pfaller et al (2004a) em *Candida glabrata* resistentes ao fluconazol.

6.5 Avaliação das associações de antifúngicos frente a *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol

Os efeitos das combinações de antifúngicos nos grupos de isolados sensíveis e resistentes de *C. dubliniensis* também foram estudados. Entre as combinações estudadas, os melhores resultados ocorreram com anfotericina B + voriconazol, seguida de anfotericina B + itraconazol e terbinafina + voriconazol, quando considerados os índices de concentração inibitória fracionária. Considerando o grupo sensível ao fluconazol (FS), a melhor atividade foi obtida pela combinação de anfotericina B com voriconazol. Quando considerado o grupo resistente (FR), a melhor atividade foi obtida pela combinação de terbinafina com itraconazol. A melhor porcentagem de sinergismo obtida entre os isolados foi de 30%, que é considerada baixa se comparada aos resultados obtidos por Barchiesi et al (1997), Barchiesi et al (1998), Weig & Muller (2001), Perea et al (2002), Barchiesi et al (2004) and Cantón et al (2005), que

encontraram interações predominantemente sinérgicas e aditivas quando terbinafina e azólicos eram combinados frente a isolados de *C. albicans* e *Candida glabrata*.

Embora a grande parte de estudos anteriores mencione antagonismo entre anfotericina B e azólicos, os dados provenientes de estudos *in vitro* permanecem controversos, e interações indiferentes e aditivas também são descritas (SUD & FEINGOLD, 1983; van ETTEN et al, 1991; MARTIN et al, 1994; VAZQUEZ et al, 1996; SAMARANAYAKE et al, 2001; SHIN & PYUN, 2004). Neste estudo, as combinações de anfotericina B e azólicos resultaram principalmente em interações indiferentes frente a *C. dubliniensis*. Portanto, os resultados descritos neste estudo estão de acordo com os diversos outros realizados com outras espécies de *Candida*. De acordo com Bolard (1986), além de se ligar ao ergosterol e aumentar a porosidade da membrana fúngica, os agentes poliênicos também parecem interagir com os fosfolípidios da membrana fúngica, induzindo, então, o extravasamento de K^+ do material citoplasmático das células fúngicas.

À exceção da combinação de caspofungina com terbinafina, as atividades *in vitro* das associações de terbinafina ou anfotericina B com azólicos frente aos isolados de *C. dubliniensis* ainda não tinham sido descritas. Gil-Lamaignere & Müller (2004) detectaram diferentes efeitos quando *C. albicans* e *C. dubliniensis* foram expostas à combinação de caspofungina e terbinafina. Frente a *C. albicans*, a combinação resultou em interações positivas, enquanto que, frente a *C. dubliniensis* isso não ocorreu. Mais interessante, os autores apenas encontraram sinérgico frente a cepas resistentes a terbinafina, que então se tornaram sensíveis ao fármaco na presença de caspofungina.

A combinação de terbinafina com itraconazol merece mais atenção uma vez que evidenciou atividades díspares: foi a pior combinação para o grupo sensível ao fluconazol (66,6% de antagonismo) e a melhor combinação para o grupo resistente ao fluconazol (30%).

Contrariamente, a terbinafina aumentou as atividades de fluconazol e itraconazol *in vitro* frente aos isolados de *C. albicans* sensíveis e resistentes ao fluconazol (BARCHIESI et al, 1998). A combinação foi também sinérgica frente aos isolados de *Candida glabrata* e nenhum antagonismo foi detectado (PEREA et al, 2002b). Importante, uma identificação cautelosa de tais espécies de *Candida* e a determinação da suscetibilidade ao fluconazol são necessárias antes que os clínicos optem pelo tratamento de muitas infecções micóticas com essas combinações.

6.6 Considerações finais

A detecção de fungos resistentes, notadamente, *Candida* spp., é um evento novo que tem requerido a atenção da comunidade médico-científica em todo o mundo. O fenômeno está sob investigação mas os percentuais de resistência apontados por estudos multicêntricos são preocupantes. Neste contexto, dois são importantes: a detecção e caracterização das espécies resistentes, e a escolha de opções terapêuticas mais efetivas.

No presente estudo, constatou-se que *C. dubliniensis*, quando resistente ao fluconazol, evidencia alterações no comportamento fenotípico, indicando que testes mais rigorosos são requeridos para a detecção ou identificação desta espécie.

As associações entre antifúngicos têm sido pouco exploradas; mas podem se constituir na única ou melhor terapêutica. Entretanto, os resultados aqui obtidos apontam para a redução de algumas atividades sinérgicas em decorrência da resistência cruzada. Estes achados, enquanto área de pesquisa, deverão ser melhor explorados, pois, disparidades entre estudos *in vitro* e *in vivo*, bem como controvérsias sobre o efeito sinérgico ou antagônico de algumas associações não permitem, ainda, sua efetiva aplicação nos pacientes acometidos de candidíases, cujos agentes sejam resistentes a determinados antimicóticos.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

- A indução de resistência de *C. dubliniensis* ao fluconazol acarretou alterações fenotípicas: notadamente, o desaparecimento dos bordos franjados e de clamidoconídios nos meios de cultura: Ágar Alecrim, Ágar DRBC, Ágar Níger e Ágar Gergelim.
- As provas de identificação fenotípica capazes de identificar *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol foram: formação de clamidoconídios e bordos franjados em Ágar Suco de Tomate, a inibição de crescimento a 45°C, a incapacidade de crescimento em caldo Sabouraud hipertônico e de assimilação de xilose e α -metil-D-glicosídeo, e a ausência de atividade lipolítica em Ágar Tween 80.
- Diante das toxinas “killer”, *C. albicans* e *C. dubliniensis* exibiram biotipos incapazes de permitir a diferenciação entre as espécies.
- A atividade de proteinase de *C. albicans* foi significativamente maior do que a de *C. dubliniensis*.
- A resistência de *C. dubliniensis* ao fluconazol não interferiu em sua atividade proteínásica.
- A atividade de proteinase não diferiu em *C. dubliniensis* e *C. albicans* quando foi avaliada sob microaerofilia, sob concentrações subinibitórias de fluconazol ou pela combinação dessas duas condições.
- Os anti-retrovirais não interferiram significativamente na atividade de *C. albicans* e *C. dubliniensis*.
- *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol evidenciaram resistência cruzada com cetoconazol, itraconazol, ravuconazol e terbinafina. Esses resultados sugerem um estudo mais detalhado quanto à utilização de modernos

antifúngicos como ravuconazol, voriconazol e caspofungina bem como o uso de agentes tradicionais como o miconazol e 5-fluorocitosina como alternativas no tratamento de candidíases resistentes a triazólicos.

- Frente a *C. dubliniensis*, as associações de anfotericina B ou terbinafina com azólicos geralmente resultaram em interações indiferentes.
- Em *C. dubliniensis* sensíveis ao fluconazol, a interação mais positiva resultou da associação de anfotericina B com voriconazol. Quando a resistência foi induzida, a melhor atividade foi encontrada quando a terbinafina foi combinada com itraconazol.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. H.; MILAN, E.P.; SANT'ANA, P.L.; OLIVEIRA, L.O.; SANTURIO, J.M.; COLOMBO, A.L. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 43: 85 – 86, 2002.

ALVES, S. H.; LINARES, C.E.; LORETO, E.S.; RODRIGUES, M.; THOMAZI, D.I.; SOUZA, F.; SANTURIO, J.M. Utilization of tomato juice agar (V8 Agar) in the presumptive identification of *Candida dubliniensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39(1): 92-93, 2006a.

ALVES, S.H.; DA MATTA, D.A.; AZEVEDO, A.C.; LORETO, E.S.; BOFF, E.; SANTURIO, J.M.; GUARRO, J. *In vitro* activities of new and conventional antimycotics against fluconazole-susceptible and non-susceptible Brazilian *Candida* spp. isolates. **Mycoses**, 49: 220-225, 2006b.

ARIKAN, S.; SANCAK, B.; HASCELİK, G. *In vitro* activity of caspofungin compared to amphotericin B, fluconazole and itraconazole against *Candida* strains isolated in a Turkish University Hospital **Medical Mycology**, 43: 171-178, 2005.

AL MOSAID, A.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's Agar. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(10):4787-4789, 2003.

BARCHIESI, F.; COLOMBO, A.L.; MCGOUGH, D.A.; FOTHERGILL, A.W.; RINALDI, M.G. *In vitro* activity of itraconazole against fluconazole-susceptible and –resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients infected with Human Immunodeficiency Virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 38 (7): 1530 –1533, 1994.

BARCHIESI, F.; FALCONI, D.F.; SCALISE, G. *In vitro* activities of terbinafine in combination with fluconazole and itraconazole against isolates of *Candida albicans* with reduced susceptibility to azoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 41: 1812-1814, 1997.

BARCHIESI, F.; DI FRANCESCO, L.F.; COMPAGNUCCI, P.; ARZENI, D.; GIACOMETTI, A.; SCALISE, G. *In vitro* interaction of terbinafine with amphotericin B, fluconazole and itraconazole against clinical isolates of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 41: 59-65, 1998.

BARCHIESI, F.; SPREGHINI, E.; MARACCI, M.; FOTHERGILL, A.W.; BALDASSARRI, I.; RINALDI, M.G.; SCALISE, G. *In vitro* activities of voriconazole in combination with three other antifungal agents against *Candida glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48(9):3317-3322, 2004.

BATES, D.W.; SU, L.; YU, D.T.; CHERTOW, G.M.; SEGER, D.L.; GOMES, D.R.; DASBACH, E.J.; PLATT, R. Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. **Clinical Infectious Diseases**, 32(5):686-93, 2001.

BEKTIĆ, J.; LELL, C.P.; FUCHS, A.; STOIBER, H.; SPETH, C.; LASS-FLÖRL, C.; BORG-VON ZEPELIN, M.; DIERICH, M.P.; WÜRZNER, R. HIV protease inhibitors attenuate adherence of *Candida albicans* to epithelial cells in vitro. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 31: 65-71, 2001.

BENDOVA, O. The killer phenomenon in yeasts. **Folia Microbiologica**, 31(5): 422 – 433, 1986.

BLANCO, M.T.; HURTADO, C.; PÉREZ-GIRALDO, C.; MORAN, F.J.; GONZÁLEZ-VELASCO, C.; GÓMEZ, A.C. Effect of ritonavir and saquinavir on *Candida albicans* growth rate and *in vitro* activity of aspartyl proteinases. **Medical Mycology**, 41: 167-170, 2003.

BOLARD, J. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? **Biochimica et Biophysica Acta**, 864(3-4): 257-304, 1986.

BORG-VON ZEPELIN, M.; MEYER, I.; THOMSEN, R.; WÜRZNER, R.; SANGLARD, D.; TELENTI, A.; MONOD, M. HIV-protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. **Journal of Investigative Dermatology**, 113: 747-751, 1999.

BORG-VON ZEPELIN, M.; NIEDERHAUS, T.; GROSS, U.; SEIBOLD, M.; MONOD, M.; TINTELNOT, K. Adherence of different *Candida dubliniensis* isolates in the presence of fluconazole. **AIDS**, 16: 1237 – 1244, 2002.

CANDIDO, R.C.; FISCHMAN, O.; ZAROR, L.; ITO, I.Y. Diferenciação de cepas de *Candida albicans* pelo sistema killer. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 28(4):321-324, 1995.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; GOBERNADO, M.; VIUDES, A.; ESPINEL-INGROFF, A. Synergistic activities of fluconazole and voriconazole with terbinafine against four *Candida* species determined by checkerboard, time-kill, and Etest methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 49(4): 1593-1596, 2005.

CAPILLA, J.; ORTONEDA, M.; PASTOR, F.J.; GUARRO, J. *In vitro* antifungal activities of the new triazole UR-9825 against clinically important filamentous fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 45(9):2635-2637, 2001.

CASSONE, C.; CAUDA, R. HIV proteinase inhibitors: do they really work against *Candida* in a clinical setting? **Trends in Microbiology**, 10(4):177-178, 2002.

CAUDA, R.; TACCONELLI, E.; TUMBARELLO, M.; MORACE, G.; DE BERNARDIS, F.; TOROSANTUCCI, A.; CASSONE, A. Role of protease inhibitors in preventing recurrent oral candidosis in patients with HIV infection: a prospective case-control study. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, 21(1): 20-25, 1999.

CHAMBERS, H.F.; SANDE, M.A. Fármacos antimicrobianos: considerações gerais. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G. (Edit.) Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 9. ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, 1996. 1436p.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Quality control minimal inhibitory concentration (MIC) limits for broth dilution and MIC interpretative breakpoints (M27-S2). Wayne, Pa: CLSI, 2006.

COLEMAN, D.; SULLIVAN, D.; HARRINGTON, B.; HAYNES, K.; HENMAN, M.; SHANLEY, D.; BENNETT, D.; MORAN, G.; MCCREARY, C.; O'NEILL, L. Molecular and phenotypic analysis of *Candida dubliniensis*: a recently identified species linked with oral candidosis in HIV-infected and AIDS patients. **Oral Diseases**, 3(Suppl.1): S96, 1997.

COLLIN, B.; CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H. Antifungal resistance in non-*albicans* *Candida* species. **Drug Resistance Updates**, 2: 9-14, 1999.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L.R.; DE ALMEIDA MONFARDINI, L.P.; CUNHA, A.K.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R.C. Prospective observational study of

candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, 28(5):570-576, 2007.

COPPING, V.M.S; BARELLE, C.J.; HUBE, B.; GOW, N.A.R.; BROWN, A.J.P.; ODDS, F.C. Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of SAP2 and SAP9 secreted proteinase genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 55: 645-654, 2005.

DE BERNARDIS, F.; SULLIVAN, P.A.; CASSONE, A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. **Medical Mycology**, 39: 303-313, 2001.

DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M.A.; MESSER, S. A.; HOUSTON, A.; HOLLIS, R.J.; DOERN, G. V.; JONES, R.N. *In vitro* activities of BMS-207147 against over 600 contemporary clinical bloodstream isolates of *Candida* species from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43 (9): 2236 – 2239, 1999.

DUPONT, B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 49 (Suppl. 1): 31-36, 2002.

DUPONT B, DROUHET E. *In vitro* synergy and antagonism of antifungal agents against yeast-like fungi. **Postgraduate Medical Journal**, 55(647):683-686, 1979.

ERNST, E.J.; KLEPSE, M.E.; PFALLER, M.A. *In vitro* interaction of fluconazole and amphotericin B administered sequentially against *Candida albicans*: effect of concentration and exposure time. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 32: 205-210, 1998.

FEKETE-FORGÁCS, K.; GYURC, L.; LENKEY, B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. **Mycoses**, 43: 273 – 279, 2000.

FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S.S.A. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Mycoses**, 48: 62-67, 2005.

GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; HOUSTON, A.K.; JOLY, S.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C.; SOLL, D.R. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and alpha-methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and vitek YBC systems. **Journal of Clinical Microbiology**, 37(12):3804-3808, 1999.

GHANNOUM, M.A.; ABU ELTEEN, K. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, 24: 407 – 413, 1986.

GHANNOUM, M.A.; FU, Y.; IBRAHIM, S.A.; MORTARA, L.A.; SHAFIQ, M.C.; EDWARDS JR, J.E.; CRIDDLE, R.S. *In vitro* determination of optimal antifungal combinations against *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 39(11): 2459-2465, 1995.

GHANNOUM, M.A.; ELEWSKI, B. Successful treatment of fluconazole-resistant oropharyngeal candidiasis by a combination of fluconazole and terbinafine. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 6(6): 921-923, 1999.

GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 12(4): 501-517, 1999.

GILFILLAN, G.D.; SULLIVAN, D.J.; HAYNES, K.; PARKINSON, T.; COLEMAN, D.C.; GOW, N.A.R. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factor. **Microbiology**, 144: 829-838, 1998.

GIL-LAMAIGNERE, C.; MÜLLER, F.-M.C. Differential effects of the combination of caspofungin and terbinafine against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida kefyr*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 23: 520-523, 2004.

GRUBER, A.; SPETH, C.; LUKASSER-VOGL, E.; ZANGERLE, R.; BORG-VON ZEPELIN, M.; DIERICHM, M.P.; WÜRZNER, R. Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor attenuates *Candida albicans* virulence properties in vitro. **Immunopharmacology**, 41: 227-234, 1999.

GUBBINS, P.O.; ANAISSIE, E. Overview of antifungal agents. **Infectious Disease Special Edition**, 5:65–70, 2002.

GUPTA, A. K.; KOHU, Y.; BATRA, R. *In vitro* activities of posaconazole, ravuconazole, terbinafine, itraconazole and fluconazole against dermatophyte, yeast and non-dermatophyte species. **Medical Mycology**, 43: 179 – 185, 2005.

HAIJEH, R.A.; SOFAIR, A.N.; HARRISON, L.H.; LYON, G.M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; MIRZA, S.A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK,

- M.A.; BRANDT, M.E.; WARNOCK, D.W. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, 42(4): 1519-1527, 2004.
- HANNULA, J.; SAARELA, M.; DOGAN, B.; PAATSAMA, J.; KOUKILA-KÄHKÖLÄ, P.; PIRINEN, S.; ALAKOMI, H-L; PERHEENTUPA, J.; ASIKAINEN, S. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. **Oral Microbiology and Immunology**, 15: 238-244, 2000.
- HAZEN, K.C.; MANDELL, G.; COLEMAN, E.; WU, G. Influence of fluconazole at subinhibitory concentrations on cell surface hydrophobicity and phagocytosis of *Candida albicans*. **FEMS Microbiology Letters**, 183: 89 – 94, 2000.
- HOEGL, L.; THOMAS-GREBER, E.; ROCKEN, M.; JORTING, H.C. HIV protease inhibitors influence the prevalence of oral candidosis in HIV-infected patients: a 2-year study. **Mycoses**, 41(7-8): 321-325, 1998.
- JEU, L.; PIACENTI, F.J.; LYAKHOVETSKIY, A.G.; FUNG, H.B. Voriconazole. **Clinical Therapeutics**, 25(5):1321-1381, 2003.
- JOHNSON, M.D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J.R.; REX, J.H. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48(3): 693-715, 2004.
- KIBBLER, C.C.; SEATON, S.; BARNES, R.A.; GRANSDEN, W.R.; HOLLIMAN, R.E.; JOHNSON, E.M.; PERRY, J.D.; SULLIVAN, D.J.; WILSON, J.A. Management and outcome of blood stream infections due to *Candida* species in England and Wales. **Journal of Hospital Infection**, 54: 18 – 24, 2003.
- KIRKPATRICK, W.R.; REVANKAR, S.G.; MCATEE, R.K.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; FOTHERGILL, A.W.; MCCARTHY, D.I.; SANCHE, S.E.; CANTU, R.A.; RINALDI, M.G.; PATTERSON, T.F. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from Human Immunodeficiency Virus-infected patients in North America and susceptibility testing of isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 36(10): 3007-3012, 1998.
- KAGAN, B.L. Mode of action of yeast killer toxin: channel formation in lipid membranes. **Nature**, 320: 709 – 711, 1983.

KOHLI, A.; SMRITI, MUKHOPADHYAY, K.; RATTAN, A.; PRASAD, R. In vitro low-level resistance to azoles in *Candida albicans* is associated with changes in membrane lipid fluidity and asymmetry. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46(4): 1046-1052, 2002.

KONDOH, Y.; SHIMIZU, K.; TANAKA, K. Proteinase production and pathogenicity of *Candida albicans*: Virulence for Mice of *Candida albicans* strains of different proteinase activity. **Microbiology and Immunology**, 31(11): 1061-1069, 1987.

KORTING, H. C.; SCHALLER, M.; EDER, G.; HAMM, G.; BOHMER, U.; HUBE, B. Effects of Human Immunodeficiency Virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on *in vitro* activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43 (8): 2038 – 2042, 1999.

KULLBERG, B.J.; SOBEL, J.D.; RUHNKE, M.; PAPPAS, P.G.; VISCOLI, C.; REX, J.H.; CLEARLY, J.D.; RUBINSTEIN, E.; CHURCH, L.W.; BROWN, J.M.; SCHLAMM, H.T.; OBORSKA, I.T.; HILTON, F.; HODGES, M.R. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. **Lancet**, 366(9495):1435-1442, 2005.

KRCMERY, V.; BARNES, A.J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **The Journal of Hospital Infection**, 50(4):243-260, 2002.

KROGH-MADSEN, M.; ARENDRUP, M.C.; HESLET, L.; KNUDSEN, J.D. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. **Clinical Infectious Diseases**, 42(7):938-44, 2006.

KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D.W.; BUGG, J.; COULTER, W.A.; READY, D.; LEWIS, M.A.O. *In vitro* susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. **Oral Microbiology and Immunology**, 20: 349-353, 2005.

KWON-CHUNG, K.J.; LEHMAN, D.; GOOD, C.;MAGEE, P.T. Genetic evidence for role of extracelullar proteinase in virulence of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, 49: 571 – 575, 1985.

LAM, M.; PETERKIN, V.; REISS, E.; MORRISON, C.J. Effect of growth conditions on the extracellular production of the aspartic proteinase by *Candida albicans*. **Advanced Experimental Medical Biology**, 306: 265 – 267, 1991.

LEWIS, R.E.; LUND, B.C.; KLEPSE, M.E.; ERNST, E.J.; PFALLER, M.A. Assessment of antifungal activities of fluconazole and amphotericin B administered alone and in combination against *Candida albicans* by using a dynamic *in vitro* mycotic infection model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 42: 1382-1386, 1998.

LEWIS, R.E.; DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; PFALLER, M.A.; KLEPSE, M.E. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 49: 345-351, 2002.

LINARES, C.E.B.; LORETO, E.S.; SILVEIRA, C.P.; POZZATTI, P.; SCHEID, L.A.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H. Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 49(4): 203-206, 2007.

LORETO, E.; POZZATTI, P.; SCHEID, L.; SANTURIO, D.; SANTURIO, J.; ALVES, S. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Ágar and oregano (*Origanum vulgare*) Ágar applied to *Candida dubliniensis* screening. In: Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 16., 2006a, Paris. **Anais...** Paris: International Society for Human and Animal Mycology, 2006..

LORETO, E.S.; BOLZAN, A.R.; LINARES, C.E.; BOFF, E.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H. Evaluation of 5 new media containing extracts of seeds applied to *Candida dubliniensis* screening. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 55(3):191-193, 2006b.

LOUIE, A.; BANERJEE, P.; DRUSANO, G.L.; SHAYEGANI, M.; MILLER, M.H. Interaction between fluconazole and amphotericin B in mice with systemic infection due to fluconazole-susceptible or –resistant strains of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43(12): 2841-2847, 1999a.

LOUIE, A.; LIU, W.; MILLER, D.A.; SUCKE, A.C.; LIU, G-F.; DRUSANO, G.L.; MAYERS, M.; MILLER, M.H. Efficacies of high-dose fluconazole plus amphotericin B and high-dose fluconazole plus 5-fluorocytosine versus amphotericin B, fluconazole, and 5-fluorocytosine monotherapies in treatment of experimental endocarditis, endophthalmitis, and pyelonephritis due to *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43(12): 2831-2840, 1999b.

MACDONALD, F.; ODDS, F.C. Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. **Journal of Medical Microbiology**, 13: 423 – 435, 1980.

MACDONALD, F.; ODDS, F.C. Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. **Journal of General Microbiology**, 129: 431 – 438, 1983.

MAERTENS, J.A. History of the development of azole derivatives. **Clinical Microbiology and Infection**, 10 (Suppl 1):1-10, 2004.

MARTIN, E.; MAYER, F.; BHAKDI, S. Antagonistic effects of fluconazole and 5-fluorocytosine on candidacidal action of amphotericin B in human serum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 38(6):1331-8, 1994.

MARTINEZ, M.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; KIRKPATRICK, W.R.; COCO, B.J.; BACHMANN, S.P.; PATTERSON, T.F. Replacement of *Candida albicans* with *Candida dubliniensis* in Human Immunodeficiency Virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, 40(9): 3135-3139, 2002.

MCCULLOUGH, M.; ROSS, B.; READE, P. Characterization of genetically distinct subgroup of *Candida albicans* strains isolated from oral cavities of patients infected with Human Immunodeficiency Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, 33(3): 696-700, 1995.

MIGLIORATI, C.A.; BIRMAN, E.G.; CURY, A.E. Oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients under treatment with protease inhibitors. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, 98(3): 301-310, 2004.

MORAN, G.P.; SULLIVAN, D.J.; HENMAN, M.C.; MCCREARY, C.E.; HARRINGTON, B.J.; SHANLEY, D.B.; COLEMAN, D.C. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 41 (3): 617 – 623, 1997.

MORAN, G.P.; SANGLARD, D.; DONNELLY, S.M.; SHANLEY, D.B.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C. Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 42(7): 1819 – 1830, 1998.

MORAN, G.P.; SULLIVAN, D.; MORSCHHAUSER, J.; COLEMAN, D. The *Candida dubliniensis* CdCDR1 gene is not essential for fluconazole resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46(9): 2829-2941, 2002.

MUNRO, C. A.; HUBE, B. Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy. **TRENDS in Microbiology**, 10 (4): 173 – 177, 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved Standard: document no, M27-A2, Wayne, P,A: NCCLS, 2002.

ODDS, F.C. Interactions among amphotericin B, 5-fluorocytosine, ketoconazole, and miconazole against pathogenic fungi *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 22(5): 763-770, 1982.

ODDS, F.C.; VAN NUFFEL, L.; DAMS, G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. **Journal of Clinical Microbiology**, 36(10):2869-2873, 1998.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 52(1):1, 2003.

OLIVEIRA, E.E.; SILVA, S.C.; SOARES, A.J.; ATTUX, C.; CRUVINEL, B.; SILVA, M.R.R. Toxinas killer e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 31(6): 523-527, 1998.

PARKINSON, T.; FALCONER, D.J.; HITCHCOCK, C. Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in *Candida glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 39: 1696-1699, 1995.

PATTON, L.L.; BONITO, A.J.; SHUGARS, D.A. A systematic review of the effectiveness of antifungal drugs for the prevention and treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, 92(2):170-179, 2001.

PEDROCHE, C. D.; CISNEROS, J.M.; LUMBRERAS, C.; AGUADO, J.M. Tratamiento con voriconazol de las infecciones fúngicas invasoras. Evaluación de la experiencia del uso compasivo de voriconazol en España. **Revista Española de Quimioterapia**, 18 (2): 149 – 158, 2005.

PEREA, S.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; WICKES, B.L.; KIRKPATRICK, W.R.; DIB, O.P.; BACHMANN, S.P.; KELLER, S.M.; MARTINEZ, M.; PATTERSON, T.F. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46(6): 1695 – 1703, 2002a.

PEREA, S.; GONZALEZ, G.; FOTHERGILL, A.W.; SUTTON, D.A.; RINALDI, M.G. *In vitro* activities of terbinafine in combination with fluconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole against clinical isolates of *Candida glabrata* with decreased susceptibility to azoles. **Journal of Clinical Microbiology**, 40(5): 1831-1833, 2002b.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; GEE, S.; JOLY, S.; PUJOL, C.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C.; SOLL, D.R. *In vitro* susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. **Journal of Clinical Microbiology**, 37(3):870-872, 1999.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(12):5729-5731, 2003.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J. Cross-resistance between fluconazole and ravuconazole and the use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to ravuconazole among 12,796 clinical isolates of *Candida* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, 42 (7): 3137 – 3141, 2004a.

PFALLER, M.A. MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J. Further standardization of broth microdilution methodology for *in vitro* susceptibility testing of caspofungin against *Candida* species by use of an international collection of more than 3,000 clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 42(7):3117-3119, 2004b.

PFALLER, M.A.; BOYKEN, L.; MESSER, S.A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D.J. *In vitro* susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution method. **Journal of Clinical Microbiology**, 43 (8): 3807 – 3810, 2005.

PINJON, E.; SULLIVAN, D.; SALKIN, I.; SHANLEY, D.; COLEMAN, D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, 36(7): 2093-2095, 1998.

PINJON, E.; MORAN, G.P.; COLIN, J.J.; KELLY, S.L.; SANGLARD, D.; COLEMAN, D.C.; SULLIVAN, D.J. Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 47(8): 2424-2437, 2003.

PINJON, E.; MORAN, G.P.; COLEMAN, D.C.; SULLIVAN, D.J. Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. **Biochemical Society Transactions**, 33(5): 1210 – 1214, 2005.

POLONELLI, L.; ARCHIBUSACCI, C.; SESTITO, M.; MORACE, G. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, 17(5): 774 – 780, 1983.

QUINDÓS, G.; RUESGA, M.T.; MARTIN-MAZUELOS, E.; SALESA, R.; ALONSO-VARGAS, R.; CARRILLO-MUNOZ, A.J.; BRENA, S.; MILLAN, R.S.; PONTON, J. *In-vitro* activity of 5-fluorocytosine against 1,021 Spanish clinical isolates of *Candida* and other medically important yeasts. **Revista Iberoamericana de Micología**, 21: 63 – 69, 2004.

RAMOS, G.; CUENCA-ESTRELLA, M.; MONZÓN, A.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L. *In-vitro* comparative activity of UR-9825, itraconazole and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 44(2):283-286, 1999.

RAY, T.L.; WUEPPER, K.D. Experimental cutaneous candidiasis in rodents, II, Role of the stratum corneum barrier and serum complement as a mediator of a protective inflammatory response. **Archives in Dermatology**, 114: 538 – 543, 1978.

REX, J.H.; PAPPAS, P.G.; KARCHMER, A.W.; SOBEL, J.; EDWARDS, J.E.; HADLEY, S.; BRASS, C.; VAZQUEZ, J.A.; CHAPMAN, S.W.; HOROWITZ, H.W.; ZERVOS, M.; MCKINSEY, D.; LEE, J.; BABINCHAK, T.; BRASHER, R.W.; CLEARY, J.D.; COHEN, D.M.; DANZIGER, L.; GOLDMAN, M.; GOODMAN, J.; HILTON, E.; HYSLOP, N.E.; KETT, D.H.; LUTZ, J.; RUBIN, R.H.; SCHELD, M.; SCHUSTER, M.; SIMMONS, B.; STEIN, D.K.; WASHBURN, R.G.; MAUTNER, L.; CHU, T-C.; PANZER, H.; SIMMONS, B.; ROSENSTEIN, R.B.; BOOTH, J. A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole plus placebo versus fluconazole plus amphotericin B as therapy for candidemia and its consequences in nonneutropenic subjects. **Clinical Infectious Diseases**, 36: 1221-1228, 2003.

ROSS, A.K.; DE BERNARDIS, F.; EMERSON, G.W.; CASSONE, A.; SULLIVAN, P.A. The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase-deficient mutant. **Journal of General Microbiology**, 136: 687-694, 1990.

RUCHEL, R. Properties of a purified proteinase from the yeast *Candida albicans*. **Biochemical and Biophysical Acta**, 659: 99- 113, 1981.

RUCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinase from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, 20: 233 – 244, 1982.

RUHNKE, M.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A.; MORSCHHÄUSER, J. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 46(2):291-295, 2000.

RYDER, N.S.; WAGNER, S.; LEITNER, R. *In vitro* activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 42(5): 1057-1061, 1998.

SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P.; YEUNG, K.W. Evaluation of polyene-azole antagonism in liquid cultures of *Candida albicans* using an automated turbidometric method. **Chemotherapy**, 47(4):279-291, 2001.

SANATI, H.; RAMOS, C.F.; BAYER, A.S.; GHANNOUM, M.A. Combination therapy with amphotericin B and fluconazole against invasive candidiasis in neutropenic-mouse and infective-endocarditis rabbit models. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 41(6): 1345-1348, 1997.

SCHALLER, M.; KRNJAIC, N.; NIEWERTH, M.; HAMM, G.; HUBE, B.; KORTING, H.C. Effect of antimycotic agents on the activity of aspartyl proteinases secreted by *Candida albicans*. **Journal of Medical Microbiology**, 52: 247-249, 2003.

SEBTI, A.; KIEHN, T.E.; PERLIN, D.; CHATURVEDI, V.; WONG, M.; DONEY, A.; PARK, S.; SEPKOWITZ, K.A. *Candida dubliniensis* at a cancer center. **Clinical Infectious Diseases**, 6: 46- 49, 2001.

SCHEID, L.A.; MARIO, D.A.N.; LORETO, E.S.; SANTURIO, D.F.; ALVES, S.H. Utilização de ágar extrato de picão (*Bidens pilosa*) e ágar dicloran-rosa de bengalacoloranfenicol (DRBC) na identificação de *C. dubliniensis*. In: VI CONGRESSO PAN-

AMERICANO E X CONGRESSO BRASILEIRO DE CONTROLE DE INFECÇÃO EPIDEMIOLOGIA HOSPITALAR, 68.. Porto Alegre, 2006. **Anais...** Porto Alegre: Associação Brasileira dos Profissionais em Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2006. 1 CD-ROM.

SCHEVEN, M.; SCHWEGLER, F. Antagonistic interactions between azoles and amphotericin B with yeasts depend on azole lipophilia for special test conditions *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 39: 1779-1783, 1995.

SCHWARZ, P.; DROMER, F.; LORTHOLARY, O.; DANNAOUI, E. *In vitro* interaction of flucytosine with conventional and new antifungals against *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 47(10):3361-3364, 2003.

SHIN, S.; PYUN, M.S. Anti-*Candida* effects of estragole in combination with ketoconazole or amphotericin B. **Phytotherapy Research**, 18(10):827-830, 2004.

SHIMOKAWA, O.; NAKAYAMA, H. Increased sensitivity of *Candida albicans* cells accumulating 14 alpha-methylated sterols to active oxygen: possible relevance to *in vivo* efficacies of azole antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 36(8):1626-1629, 1992.

SILVA, G.M.; SILVEIRA, F.R.X.; PIRES, M.F.C. Adherence to HeLa cell, typing by killer toxins and susceptibility to antifungal agents of *Candida dubliniensis* strains. **Brazilian Oral Research**, 21(1): 87-91, 2007.

SLIFKIN, M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, 38(12): 4626-4628, 2000.

STAIB, P.; MORSCHHAUSER, J. Chlamydospore formation on Staib Ágar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. **Mycoses**, 42: 521 – 524, 1999.

STAIB, P.; MORSCHHAUSER, J. Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* – an enigmatic developmental programme. **Mycoses**, 50: 1-12, 2006.

STEINBACH, W. J.; BENJAMIN, D. K. New antifungal agents under development in children and neonates. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 18: 484 – 489, 2005.

STOKES, C.; MORAN, G.P.; SPIERING, M.J.; COLE, G.T.; COLEMAN, D.C.; SULLIVAN, D.J. Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*. **Fungal Genetics and Biology**, doi: 10.1016/j.fgb.2006.11.014, 2007.

SUD, I.J.; FEINGOLD, D.S. Effect of ketoconazole on the fungicidal action of amphotericin B in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 23(1):185-187, 1983.

SUGAR, A.M. Interactions of amphotericin B and SCH 39304 in the treatment of experimental murine candidiasis: lack of antagonism of a polyene-azole combination. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 35(8):1669-71, 1991.

SUGAR, A.M. Use of amphotericin B with azole antifungal drugs: what are we doing? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 39(9): 1907-1912, 1995.

SULLIVAN, D. J.; WESTERNENG, T.J.; HAYNES, K.A.; BENNETTI, D.E.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology**, 141 (Pt 7): 1507 – 1521, 1995.

SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. **Journal of Clinical Microbiology**, 36(2):329-334, 1998.

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.P.; PINJON, E.; AL-MOSAID, A.; STOKES, C.; VAUGHAN, C.; COLEMAN, D.C. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, 4: 369-376, 2004.

SWINNE, D.; WATELLE, M.; NOLARD N. *In vitro* activities of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against non *Candida albicans* yeast isolates. **Revista Iberoamericana de Micología**, 22(1):24-28, 2005.

TERRELL, C.L. Antifungal agents. Part II. The azoles. **Mayo Clinical Procedures**, 74: 78-100, 1999.

TINTELNOT, K.; HAASE, G.; SEIBOLD, M.; BERGMANN, F.; STAEMMLER, M.; FRANZ, T.; NAUMANN, D. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 38(4):1599-1608, 2000.

TITSWORTH, E. GRUNBERG, E. Chemotherapeutic activity of 5-fluorocytosine and amphotericin B against *Candida albicans* in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 4(3):306-308, 1973.

VAN DER AUWERA, P.; CEUPPENS, A.M.; HEYMANS, C.; MEUNIER, F. *In vitro* evaluation of various antifungal agents alone and in combination by using an automatic turbidimetric system combined with viable count determinations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 29(6): 997-1004, 1986.

VAN ETTEN, E.W.; VAN DE RHEE, N.E.; VAN KAMPEN, K.M.; BAKKER-WOUDENBERG, G.I.A. Effects of amphotericin B and fluconazole on the extracellular and intracellular growth of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 35(11):2275-2281, 1991.

VAZQUEZ, J.A.; ARGANOZA, M.T.; VAISHAMPAYAN, J.K.; AKINS, R.A. *In vitro* interaction between amphotericin B and azoles in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 40(11):2511-2516, 1996.

VAZQUEZ, J.A. Combination antifungal therapy against *Candida* species: the new frontier – are we there yet? **Medical Mycology**, 41: 355-368, 2003.

VIDOTTO, V.; PONTÓN, J.; AOKI, S.; QUINDÓS, G.; MANTOAN, B.; PUGLIESE, A.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K. Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. **Revista Iberoamericana de Micología**, 21: 70-74, 2004.

VIERA, M.A.T. Aspectos epidemiológicos. **Drugs of Today**, 42(Supl. II/BR): 3-12, 2006.

VILELA, M.M.S.; KAMEI, K.; TANAKA, R.; UNO, J.; TAKAHASHI, I.; ITO, J.; YARITA, K.; MIYAJI, M. Pathogenicity and virulence of *Candida dubliniensis*: comparison with *Candida albicans*. **Medical Mycology**, 40: 249-257, 2002.

VIUDES, A.; PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; LÓPEZ-RIBOT, J.; GOBERNADO, M. The activity of systemic antimycotic drug combinations. **Revista Española de Quimioterapia**, 14(1):30-39, 2001.

WALDORF, A.R.; POLAK, A. Mechanisms of action of 5-Fluorocytosine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 23(1): 79-85, 1983.

WEIG, M.; MÜLLER, F.M. Synergism of voriconazole and terbinafine against *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 45(3):966-968, 2001.

WIRSCHING, S.; MORAN, G.P.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C.; MORSCHHAUSER, J. MDR1-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 45(12): 3416 – 3421, 2001.

WU, T.; WRIGHT, K.; HURST, S.F.; MORRISON, C.J. Enhanced extracellular production of aspartyl proteinase, a virulence factor, by *Candida albicans* isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 44(5): 1220 – 1208, 2000.

9 APÊNDICES

APÊNDICE **A1A1** - Características fenotípicas de *C. dubliniensis* sensíveis ao fluconazol.

Excluído: A

Isolados	ALEC	GERG	NÍG	DRBC	V8	45°C	SABh	Tween	XIL	MDG
Cd 01 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 02 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 03 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 04 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 05 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 06 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 07 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 08 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 09 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 10 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 11 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 12 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 13 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 14 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 15 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 16 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 17 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 18 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 19 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 20 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 21 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 22 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 23 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 24 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 25 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 26 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 27 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 28 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 29 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Cd 31 S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Produção de clamidoconídios em Ágar Alecrim (ALEC), Ágar Gergelim (GERG), Ágar Níger (NIG), Ágar DRBC e Ágar Suco de Tomate (V8); crescimento em Ágar Sabouraud a 45°C, em Caldo Sabouraud contendo

6,5% de NaCl (SABh); produção de halo opaco em Ágar Tween 80; e assimilação de xilose (XIL) e α -metil-D-glicosídeo (MDG).

APÊNDICE B2B2 - Características fenotípicas de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol.

Excluído: B

Isolados	ALEC	GERG	NÍG	DRBC	V8	45°C	SABh	Tween	XIL	MDG
Cd 01 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 02 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 03 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 04 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 05 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 06 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 07 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 08 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 09 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 10 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 11 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 12 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 13 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 14 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 15 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 16 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 17 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 18 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 19 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 20 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 21 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Cd 22 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 23 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 24 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 25 R	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Cd 26 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 27 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 28 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 29 R	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cd 31 R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-

Produção de clamidoconídios em Ágar Alecrim (ALEC), Ágar Gergelim (GERG), Ágar Níger (NIG), Ágar DRBC e Ágar Suco de Tomate (V8); crescimento em Ágar Sabouraud a 45°C, em Caldo Sabouraud contendo 6,5% de NaCl (SABh); produção de halo opaco em Ágar Tween 80; e assimilação de xilose (XIL) e α -metil-D-glicosídeo (MDG).

APÊNDICE C3C3- Atividades de proteinase (em unidades de absorvância) de *Candida albicans* (sensíveis ao fluconazol) sob microaerofilia (I), concentrações subinibitórias de fluconazol (II) e combinação das duas condições (III).

Excluído: C

Isolados	Controle	I	II	III
FC 01	0,098	0,001	0,080	0,165
FC 14	0,047	0,016	0,047	0,126
FC 15	0,032	0,248	0,062	0,125
FC 16	0,049	0,089	0,081	0,104
FC 20	0,222	0,118	0,006	0,122
FC 22	0,116	0,131	0,100	0,065
FC 31	0,103	0,049	0,214	0,198
FC 32	0,123	0,023	0,006	0,012
FC 40	0,083	0,029	0,050	0,040
FC 42	0,354	0,211	0,059	0,070
FC 51	0,159	0,133	0,304	0,173
HU 01	0,089	0,077	0,098	0,128
HU 03	0,049	0,079	0,038	0,101
HU 04	0,158	0,093	0,163	0,144
HU 07	0,073	0,060	0,042	0,143
HU 08	0,119	0,201	0,032	0,133
HU 12	0,012	0,048	0,011	0,016
HU 16	0,139	0,086	0,168	0,091
HU 20	0,132	0,110	0,267	0,105
HU 22	0,275	0,087	0,344	0,150
HU 27	0,105	0,503	0,078	0,230
HU 28	0,113	0,167	0,159	0,040
HU 40	0,183	0,092	0,090	0,078
HU 44	0,331	0,060	0,043	0,428
HU 58	0,061	0,206	0,109	0,227
HU 59	0,110	0,041	0,040	0,133
HU 63	0,072	0,094	0,094	0,108
HU 65	0,133	0,012	0,069	0,070
SC 08	0,112	0,230	0,158	0,267
SC 17	0,087	0,085	0,094	0,060

APÊNDICE D4D4- Atividade de proteinase dos isolados de *Candida albicans* frente aos anti-retrovirais inibidores de protease nelfinavir (IV), indinavir (V) e ritonavir (VI).

Excluído: D

Isolados	Controle	IV	V	VI
FC 01	0,098	0,037	0,100	0,146
FC 14	0,068	0,080	0,043	0,092
FC 15	0,273	0,188	0,087	0,164
FC 16	0,021	0,059	0,019	0,119
FC 20	0,062	0,030	0,050	0,104
FC 22	0,186	0,168	0,164	0,145
FC 31	0,103	0,151	0,090	0,107
FC 32	0,175	0,167	0,156	0,125
FC 40	0,137	0,184	0,155	0,162
FC 42	0,015	0,020	0,027	0,041
FC 51	0,374	0,245	0,232	0,147
HU 01	0,218	0,185	0,121	0,063
HU 03	0,205	0,094	0,074	0,007
HU 04	0,215	0,180	0,135	0,218
HU 07	0,261	0,193	0,142	0,206
HU 08	0,297	0,151	0,125	0,054
HU 12	0,632	0,222	0,022	0,006
HU 16	0,128	0,153	0,077	0,142
HU 20	0,135	0,073	0,034	0,193
HU 22	0,152	0,130	0,067	0,106
HU 27	0,168	0,145	0,139	0,110
HU 28	0,113	0,032	0,098	0,081
HU 40	0,047	0,113	0,070	0,156
HU 44	0,331	0,225	0,289	0,018
HU 58	0,061	0,802	0,234	0,182
HU 59	0,110	0,066	0,113	0,051
HU 63	0,100	0,139	0,489	0,151
HU 65	0,177	0,228	0,026	0,049
SC 08	0,148	0,104	0,100	0,104
SC 17	0,172	0,152	0,147	0,144

APÊNDICE **ESES** - Atividades de proteinase (em unidades de absorvância) de *Candida dubliniensis* sensíveis ao fluconazol sob microaerofilia (I), concentrações subinibitórias de fluconazol (II) e combinação das duas condições (III).

Excluído: E

Isolados	Controle	I	II	III
Cd 01 S	0,128	0,120	0,194	0,140
Cd 02 S	0,038	0,007	0,088	-0,060
Cd 03 S	0,064	0,062	0,034	0,038
Cd 04 S	0,072	0,034	0,131	0,105
Cd 05 S	0,213	0,036	0,115	0,010
Cd 06 S	0,050	0,090	0,040	0,092
Cd 07 S	0,132	0,112	0,258	0,107
Cd 08 S	0,096	0,113	0,152	0,226
Cd 09 S	0,162	0,168	0,116	0,062
Cd 10 S	0,100	0,130	0,099	0,164
Cd 11 S	0,018	0,138	0,005	0,005
Cd 12 S	0,052	0,066	0,114	0,156
Cd 13 S	0,077	0,128	0,294	0,274
Cd 14 S	0,370	0,601	0,389	0,181
Cd 15 S	0,130	0,438	0,177	0,231
Cd 16 S	0,073	0,033	0,177	0,217
Cd 17 S	0,057	0,066	0,082	0,059
Cd 18 S	0,082	0,064	0,116	0,048
Cd 19 S	0,061	0,121	0,114	0,092
Cd 20 S	0,076	0,094	0,118	0,102
Cd 21 S	0,173	0,113	0,167	0,143
Cd 22 S	0,110	0,232	0,134	0,323
Cd 23 S	0,052	0,146	0,138	0,211
Cd 24 S	0,129	0,071	0,097	0,108
Cd 25 S	0,154	0,121	0,141	0,072
Cd 26 S	0,064	0,043	0,049	0,087
Cd 27 S	0,036	0,055	0,044	0,062
Cd 28 S	0,081	0,036	0,033	0,059
Cd 29 S	0,018	0,122	0,023	0,106
Cd 30 S	0,041	0,093	0,070	0,102

APÊNDICE F6F6 - Atividade de proteinase dos isolados de *Candida dubliniensis* sensíveis ao fluconazol frente aos anti-retrovirais inibidores de protease nelfinavir (IV), indinavir (V) e ritonavir (VI).

Excluído: F

Isolados	Controle	IV	V	VI
Cd 01 S	0,128	0,154	0,183	0,001
Cd 02 S	0,092	0,094	0,056	0,129
Cd 03 S	0,084	0,137	0,083	0,094
Cd 04 S	0,072	-0,012	0,035	0,094
Cd 05 S	0,229	0,044	0,199	0,197
Cd 06 S	0,045	0,077	0,057	0,094
Cd 07 S	0,257	0,147	0,276	0,135
Cd 08 S	0,109	0,154	0,243	0,121
Cd 09 S	0,108	0,097	0,109	0,157
Cd 10 S	0,100	0,141	0,164	0,139
Cd 11 S	0,198	0,351	0,311	0,238
Cd 12 S	0,114	0,106	0,223	0,047
Cd 13 S	0,041	0,028	0,036	0,038
Cd 14 S	0,098	0,042	0,135	0,120
Cd 15 S	0,219	0,148	0,239	0,306
Cd 16 S	0,208	0,196	0,029	0,018
Cd 17 S	0,034	0,078	0,025	0,052
Cd 18 S	0,081	0,211	0,165	0,092
Cd 19 S	0,069	0,672	0,374	0,218
Cd 20 S	0,100	0,077	0,230	0,129
Cd 21 S	0,167	0,144	0,131	0,146
Cd 22 S	0,157	0,166	0,149	0,135
Cd 23 S	0,102	0,097	0,107	0,173
Cd 24 S	0,181	0,139	0,113	0,200
Cd 25 S	0,055	0,072	0,082	0,484
Cd 26 S	0,261	0,164	0,069	0,063
Cd 27 S	0,062	0,176	0,049	0,099
Cd 28 S	0,082	0,044	0,103	0,034
Cd 29 S	0,160	0,169	0,190	0,163
Cd 31 S	0,036	0,032	0,116	0,106

APÊNDICE G7G7- Atividades de proteinase (em unidades de absorvância) de *Candida dubliniensis* resistentes ao fluconazol sob microaerofilia (I), concentrações subinibitórias de fluconazol (II) e combinação das duas condições (III).

Excluído: G

Isolados	Controle	I	II	III
Cd 01 R	0,218	0,143	0,180	0,118
Cd 02 R	0,034	0,237	0,148	0,122
Cd 03 R	0,102	0,096	0,198	0,160
Cd 04 R	0,155	0,217	0,260	0,250
Cd 05 R	0,170	0,100	0,105	0,105
Cd 06 R	0,172	0,111	0,141	0,100
Cd 07 R	0,109	0,084	0,140	0,227
Cd 08 R	0,097	0,131	0,083	0,075
Cd 09 R	0,112	0,113	0,151	0,082
Cd 10 R	0,083	0,102	0,140	0,242
Cd 11 R	0,036	0,062	0,060	0,088
Cd 12 R	0,061	0,043	0,129	0,027
Cd 13 R	0,230	0,022	0,027	0,073
Cd 14 R	0,093	0,368	0,122	0,092
Cd 15 R	0,124	0,141	0,108	0,089
Cd 16 R	0,099	0,114	0,210	0,093
Cd 17 R	0,152	0,167	0,130	0,167
Cd 18 R	0,104	0,073	0,042	0,066
Cd 19 R	0,080	0,148	0,103	0,095
Cd 20 R	0,072	0,089	0,079	0,077
Cd 21 R	0,096	0,128	0,134	0,140
Cd 22 R	0,050	0,157	0,107	0,121
Cd 23 R	0,114	0,154	0,093	0,286
Cd 24 R	0,080	0,100	0,142	0,133
Cd 25 R	0,076	0,137	0,107	0,157
Cd 26 R	0,049	0,092	0,126	0,141
Cd 27 R	0,130	0,066	0,146	0,090
Cd 28 R	0,125	0,110	0,135	0,147
Cd 29 R	0,102	0,114	0,093	0,209
Cd 31 R	0,105	0,075	0,094	0,087

APÊNDICE H8H8- Atividade de proteinase (unidades de absorvância) dos isolados de *Candida dubliniensis* resistentes ao fluconazol frente aos anti-retrovirais inibidores de protease nelfinavir (IV), indinavir (V) e ritonavir (VI).

Excluído: H

Isolados	Controle	IV	V	VI
Cd 01 R	0,218	0,124	0,092	0,013
Cd 02 R	0,034	0,107	0,193	0,150
Cd 03 R	0,102	0,252	0,134	0,177
Cd 04 R	0,155	0,115	0,218	0,204
Cd 05 R	0,170	0,209	0,108	0,118
Cd 06 R	0,172	0,163	0,143	0,147
Cd 07 R	0,109	0,154	0,129	0,104
Cd 08 R	0,097	0,074	0,131	0,106
Cd 09 R	0,112	0,080	0,081	0,119
Cd 10 R	0,083	0,114	0,112	0,119
Cd 11 R	0,036	0,070	0,086	0,122
Cd 12 R	0,061	0,312	0,041	0,335
Cd 13 R	0,230	0,227	0,063	0,027
Cd 14 R	0,093	0,085	0,096	0,100
Cd 15 R	0,124	0,141	0,147	0,206
Cd 16 R	0,099	0,086	0,091	0,198
Cd 17 R	0,152	0,163	0,164	0,215
Cd 18 R	0,104	0,038	0,057	0,061
Cd 19 R	0,080	0,067	0,095	0,102
Cd 20 R	0,072	0,063	0,210	0,101
Cd 21 R	0,096	0,146	0,137	0,098
Cd 22 R	0,050	0,159	0,165	0,084
Cd 23 R	0,114	0,135	0,182	0,170
Cd 24 R	0,080	0,142	0,195	0,102
Cd 25 R	0,076	0,236	0,171	0,368
Cd 26 R	0,049	0,097	0,066	0,131
Cd 27 R	0,130	0,098	0,120	0,106
Cd 28 R	0,125	0,125	0,118	0,156
Cd 29 R	0,102	0,203	0,095	0,136
Cd 31 R	0,105	0,076	0,166	0,203

APÊNDICE 1919 - Biotipos de suscetibilidade de *Candida albicans* às toxinas “killer”.

Excluído: I

Isolados	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	Biotipos
FC 01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	111
FC 14	-	-	-	+	-	+	-	-	+	837
FC 20	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
FC 21	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
FC 22	-	+	-	+	+	+	-	+	+	614
FC 30	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
FC 31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	111
FC 32	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
FC 35	-	+	+	+	+	+	+	+	+	411
FC 39	-	+	-	-	+	+	+	+	+	641
FC 51	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
HU 01	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
HU 03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	111
HU 04	-	-	-	+	-	+	-	+	+	834
HU 05	+	+	+	-	-	+	+	+	+	171
HU 07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	888
HU 12	+	+	-	+	+	+	--	-	+	217
HU 16	-	+	+	+	+	+	-	-	-	418
HU 20	-	+	-	+	+	+	-	-	-	618
HU 22	-	+	-	+	+	+	+	+	+	611
HU 27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	111
HU 40	-	+	-	+	+	+	+	+	+	611
HU 44	-	+	-	-	+	+	+	+	+	641
HU 58	-	+	-	+	+	+	+	+	+	611
HU 65	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
SC 04	-	+	-	-	+	+	+	+	+	641
SC 10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	111
SC 11	-	+	-	-	+	+	+	+	+	641
SC 12	-	+	+	-	+	+	+	+	+	441
SC 15	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211

APÊNDICE J10J10 – Biotipos de suscetibilidade de *Candida dubliniensis* às toxinas “killer”.

Excluído: J

Isolados	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	Biotipos
Cd 01 S	-	+	-	+	+	+	-	+	+	614
Cd 02 S	-	+	-	+	+	+	+	+	+	611
Cd 03 S	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
Cd 04 S	+	-	-	+	+	+	+	+	+	511
Cd 05 S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	888
Cd 06 S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	111
Cd 07 S	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
Cd 08 S	-	+	-	+	+	+	+	+	-	612
Cd 09 S	-	+	-	+	+	+	+	+	+	611
Cd 10 S	-	+	-	+	+	+	+	+	+	611
Cd 11 S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	111
Cd 12 S	-	+	-	+	+	+	+	+	+	611
Cd 13 S	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
Cd 14 S	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
Cd 15 S	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
Cd 16 S	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
Cd 17 S	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
Cd 18 S	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
Cd 19 S	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
Cd 20 S	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
Cd 21 S	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
Cd 22 S	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
Cd 23 S	-	+	-	+	+	+	+	+	+	611
Cd 24 S	+	+	-	-	-	+	+	+	+	271
Cd 25 S	+	+	-	-	+	+	+	+	+	241
Cd 26 S	+	+	-	+	+	+	+	+	+	211
Cd 27 S	+	+	-	+	+	+	-	+	+	214
Cd 28 S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	888
Cd 29 S	+	+	-	-	-	+	+	+	+	241
Cd 31 S	+	+	-	-	-	+	+	+	+	271

APÊNDICE K11K11 - Suscetibilidade (µg/mL) dos isolados de *Candida dubliniensis* sensíveis ao fluconazol (FLC) frente a anfotericina B (AMB), caspofungina (CSP), cetoconazol (CTC), itraconazol (ITC), miconazol (MCN), voriconazol (VRC), 5-fluorocitosina (5-FC), ravuconazol (RVC) e terbinafina (TRB).

Excluído: K

Isolados	FLC	AMB	CSP	CTC	ITC	MCN	VRC	5 - FC	RVC	TRB
Cd 01 S	0,125	0,125	0,125	0,030	0,008	0,125	0,002	0,125	0,125	8,000
Cd 02 S	0,25	0,5	0,125	0,030	0,015	0,030	0,015	0,125	0,125	0,500
Cd 03 S	0,25	0,25	0,125	0,030	0,008	0,030	0,002	0,125	0,125	0,500
Cd 04 S	0,25	0,25	0,125	0,030	0,008	0,030	0,002	0,125	0,125	0,060
Cd 05 S	0,25	0,125	0,125	0,030	0,015	0,030	0,004	0,125	0,125	0,250
Cd 06 S	0,125	0,25	0,125	0,030	0,008	0,030	0,002	0,125	0,125	1,000
Cd 07 S	0,25	0,125	0,125	0,030	0,015	0,030	0,004	0,125	0,125	1,000
Cd 08 S	0,5	0,125	0,125	0,030	0,03	0,030	0,004	0,125	0,125	1,000
Cd 09 S	0,5	0,25	4,000	0,030	0,06	0,250	0,008	0,125	0,125	2,000
Cd 10 S	0,5	0,25	2,000	0,030	0,125	0,030	0,008	0,25	0,125	1,000
Cd 11 S	0,125	0,25	0,250	0,060	0,25	8,000	0,125	0,125	1,000	2,000
Cd 12 S	0,5	0,125	0,125	0,030	0,015	0,125	0,125	0,125	0,125	0,060
Cd 13 S	0,25	0,25	0,125	0,030	0,008	0,030	0,001	0,125	0,125	1,000
Cd 14 S	0,25	0,125	0,125	0,030	0,06	0,250	0,125	0,125	0,125	4,000
Cd 15 S	0,125	0,125	0,125	0,030	0,125	0,250	0,004	0,125	0,125	1,000
Cd 16 S	0,125	0,125	0,125	0,060	0,125	1,000	0,004	0,125	4,000	2,000
Cd 17 S	0,125	0,25	0,125	0,030	0,03	0,125	0,001	0,25	0,125	0,500
Cd 18 S	0,125	0,125	0,125	0,030	0,015	0,125	0,002	0,125	0,125	0,125
Cd 19 S	0,125	0,125	0,125	0,030	0,06	0,030	0,004	0,125	0,125	0,060
Cd 20 S	0,25	0,25	0,125	0,030	0,03	0,500	0,008	0,125	0,125	2,000
Cd 21 S	0,25	0,125	1,000	0,030	0,125	0,030	0,004	0,125	0,125	0,125
Cd 22 S	0,125	0,25	0,125	0,030	0,03	0,030	0,004	0,125	0,125	1,000
Cd 23 S	0,25	0,25	0,125	0,030	0,015	0,030	0,004	0,125	0,125	2,000
Cd 24 S	0,06	0,25	0,125	0,030	0,03	0,125	0,002	0,125	0,125	0,125
Cd 25 S	0,125	0,25	0,250	0,030	0,06	0,125	0,004	0,125	0,125	16,000
Cd 26 S	0,125	0,06	0,125	0,030	0,06	0,125	0,004	0,125	0,250	0,060
Cd 27 S	0,125	0,5	0,125	0,030	0,25	0,250	0,008	0,125	0,125	8,000
Cd 28 S	0,125	0,5	0,125	0,030	0,015	0,030	0,004	0,125	0,125	2,000
Cd 29 S	0,125	0,5	0,125	0,030	0,06	0,500	0,06	0,125	0,250	4,000
Cd 31 S	0,125	0,5	0,3	0,250	0,06	2,000	0,004	0,125	0,125	0,500

APÊNDICE L12L12- Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados de *Candida dubliniensis* resistentes ao fluconazol (FLC) frente a anfotericina B (AMB), caspofungina (CSP), cetoconazol (CTC), itraconazol (ITC), miconazol (MCN), voriconazol (VRC), 5-fluorocitosina (5-FC), ravuconazol (RVC) e terbinafina (TRB).

Excluído: L

Isolados	FLC	AMB	CSP	CTC	ITC	MCN	VRC	5 - FC	RVC	TRB
Cd 01 R	256	1,00	0,250	8,000	128	4,000	1,00	0,125	16,00	128
Cd 02 R	128	1,00	0,250	4,000	128	1,000	0,25	0,125	1,00	64
Cd 03 R	256	2,00	0,500	4,000	64	8,000	2,00	0,125	8,00	128
Cd 04 R	128	1,00	0,500	4,000	128	8,000	2,00	0,125	8,00	128
Cd 05 R	256	2,00	0,250	4,000	128	4,000	2,00	0,125	16,00	128
Cd 06 R	256	1,00	0,500	4,000	128	4,000	4,00	0,125	8,00	256
Cd 07 R	128	1,00	0,500	4,000	128	2,000	2,00	0,125	4,00	128
Cd 08 R	128	1,00	0,500	4,000	128	2,000	2,00	0,125	2,00	128
Cd 09 R	128	2,00	0,250	4,000	128	4,000	0,50	0,125	8,00	128
Cd 10 R	256	1,00	0,250	8,000	32	8,000	1,00	0,25	8,00	128
Cd 11 R	256	0,50	0,250	8,000	128	8,000	2,00	0,125	16,000	128
Cd 12 R	128	0,50	1,000	4,000	64	2,000	2,00	0,125	8,00	64
Cd 13 R	64	0,25	1,000	4,000	64	8,000	4,00	0,125	16,00	128
Cd 14 R	128	2,00	0,250	4,000	64	8,000	4,00	0,125	16,00	64
Cd 15 R	256	2,00	0,250	4,000	128	4,000	4,00	0,125	8,00	128
Cd 16 R	128	1,00	0,500	8,000	128	2,000	4,00	0,125	16,000	256
Cd 17 R	128	2,00	0,250	8,000	128	8,000	8,00	0,25	8,00	256
Cd 18 R	128	0,25	0,500	4,000	128	2,000	8,00	0,125	8,00	256
Cd 19 R	64	1,00	0,250	2,000	64	2,000	16,00	0,125	0,50	256
Cd 20 R	128	1,00	0,250	8,000	128	4,000	2,00	0,125	16,00	256
Cd 21 R	128	0,25	1,000	4,000	64	1,000	2,00	0,125	8,00	256
Cd 22 R	128	1,00	0,250	8,000	512	4,000	1,00	0,125	8,00	128
Cd 23 R	128	1,00	0,250	4,000	128	1,000	0,50	0,125	1,00	256
Cd 24 R	64	0,25	8,000	8,000	64	4,000	0,50	0,125	4,00	128
Cd 25 R	64	1,00	0,250	8,000	64	2,000	0,50	0,125	8,00	256
Cd 26 R	256	1,00	0,250	8,000	64	2,000	4,00	0,125	8,000	256
Cd 27 R	128	0,50	0,250	8,000	256	2,000	2,00	0,125	8,00	128
Cd 28 R	128	1,00	0,500	4,000	128	8,000	4,00	0,125	8,000	128
Cd 29 R	64	1,00	0,250	4,000	128	4,000	2,00	0,125	4,000	256
Cd 31 R	128	2,00	0,3	8,000	512	2,000	4,00	0,125	16,00	256

APÊNDICE M13M13- Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de anfotericina B combinadas com itraconazol em isolados de *Candida dubliniensis* sensíveis ao fluconazol.

Excluído: M

Isolados	CIM (µg/mL) Itraconazol		CIM (µg/mL) Anfotericina B	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
Cd 01 S	0,008	0,06	0,125	0,5
Cd 02 S	0,015	0,125	0,5	0,25
Cd 03 S	0,008	0,125	0,25	0,25
Cd 04 S	0,008	0,015	0,25	0,25
Cd 05 S	0,015	0,125	0,125	0,125
Cd 06 S	0,008	0,125	0,25	0,125
Cd 07 S	0,015	0,125	0,125	0,125
Cd 08 S	0,03	0,06	0,125	0,125
Cd 09 S	0,06	0,008	0,25	0,008
Cd 10 S	0,125	0,015	0,25	0,015
Cd 11 S	0,25	0,06	0,25	0,015
Cd 12 S	0,015	0,008	0,125	0,125
Cd 13 S	0,008	0,03	0,25	0,015
Cd 14 S	0,06	0,015	0,125	0,015
Cd 15 S	0,125	0,015	0,125	0,03
Cd 16 S	0,125	0,015	0,125	0,125
Cd 17 S	0,03	0,015	0,25	0,015
Cd 18 S	0,015	0,015	0,125	0,125
Cd 19 S	0,06	0,015	0,125	0,125
Cd 20 S	0,03	0,03	0,25	0,06
Cd 21 S	0,125	0,015	0,125	0,06
Cd 22 S	0,03	0,008	0,25	0,06
Cd 23 S	0,015	0,008	0,25	0,06
Cd 24 S	0,03	0,03	0,25	0,125
Cd 25 S	0,06	0,015	0,25	0,25
Cd 26 S	0,06	0,015	0,06	0,25
Cd 27 S	0,25	0,125	0,5	0,25
Cd 28 S	0,015	0,125	0,5	0,06
Cd 29 S	0,06	0,015	0,5	0,25
Cd 31 S	0,06	0,03	0,5	0,125

APÊNDICE N14N14 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de anfotericina B combinadas com voriconazol em isolados de *Candida dubliniensis* sensíveis ao fluconazol.

Excluído: N

Isolados	CIM (µg/mL) Voriconazol		CIM (µg/mL) Anfotericina B	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
Cd 01 S	0,002	0,008	0,125	0,002
Cd 02 S	0,015	0,008	0,5	0,002
Cd 03 S	0,002	0,008	0,25	0,002
Cd 04 S	0,002	0,008	0,25	0,002
Cd 05 S	0,004	0,008	0,125	0,002
Cd 06 S	0,002	0,008	0,25	0,002
Cd 07 S	0,004	0,004	0,125	0,002
Cd 08 S	0,004	0,004	0,125	0,002
Cd 09 S	0,008	0,004	0,25	0,002
Cd 10 S	0,008	0,004	0,25	0,002
Cd 11 S	0,125	0,25	0,25	0,06
Cd 12 S	0,125	0,004	0,125	0,002
Cd 13 S	0,001	0,008	0,25	0,002
Cd 14 S	0,125	0,008	0,125	0,002
Cd 15 S	0,004	0,015	0,125	0,001
Cd 16 S	0,004	0,03	0,125	0,03
Cd 17 S	0,001	0,002	0,25	0,002
Cd 18 S	0,002	0,008	0,125	0,25
Cd 19 S	0,004	0,008	0,125	0,002
Cd 20 S	0,008	0,125	0,25	0,06
Cd 21 S	0,004	0,008	0,125	0,06
Cd 22 S	0,004	0,002	0,25	0,06
Cd 23 S	0,004	0,001	0,25	0,125
Cd 24 S	0,002	0,008	0,25	0,125
Cd 25 S	0,004	0,06	0,25	0,125
Cd 26 S	0,004	0,008	0,06	0,06
Cd 27 S	0,008	0,06	0,5	4
Cd 28 S	0,004	0,125	0,5	0,125
Cd 29 S	0,06	0,06	0,5	4
Cd 31 S	0,004	0,03	0,5	0,125

APÊNDICE 015015 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de terbinafina combinadas com itraconazol em isolados de *Candida dubliniensis* sensíveis ao fluconazol.

Excluído: O

Isolados	CIM (µg/mL) Itraconazol		CIM (µg/mL) Terbinafina	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
Cd 01 S	0,008	0,06	8	2
Cd 02 S	0,015	0,03	0,5	2
Cd 03 S	0,008	0,125	0,5	16
Cd 04 S	0,008	0,015	0,06	2
Cd 05 S	0,015	0,03	0,25	2
Cd 06 S	0,008	0,03	1	4
Cd 07 S	0,015	0,06	1	4
Cd 08 S	0,03	0,06	1	8
Cd 09 S	0,06	0,008	2	4
Cd 10 S	0,125	0,015	1	0,5
Cd 11 S	0,25	0,015	2	2
Cd 12 S	0,015	0,125	0,06	2
Cd 13 S	0,008	0,03	1	1
Cd 14 S	0,06	0,125	4	2
Cd 15 S	0,125	0,03	1	2
Cd 16 S	0,125	0,06	2	8
Cd 17 S	0,03	0,06	0,5	4
Cd 18 S	0,015	0,03	0,125	4
Cd 19 S	0,06	0,03	0,06	1
Cd 20 S	0,03	0,06	2	2
Cd 21 S	0,125	0,008	0,125	0,5
Cd 22 S	0,03	0,03	1	2
Cd 23 S	0,015	0,015	2	1
Cd 24 S	0,03	0,008	0,125	2
Cd 25 S	0,06	0,008	16	1
Cd 26 S	0,06	0,03	0,06	2
Cd 27 S	0,25	0,25	8	32
Cd 28 S	0,015	0,25	2	4
Cd 29 S	0,06	0,06	4	32
Cd 31 S	0,06	0,03	0,5	1

APÊNDICE P16P16- Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de terbinafina combinadas com voriconazol em isolados de *Candida dubliniensis* sensíveis ao fluconazol.

Excluído: P

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Voriconazol		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Terbinafina	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
Cd 01 S	0,002	0,001	8	1
Cd 02 S	0,015	0,008	0,5	2
Cd 03 S	0,002	0,04	0,5	2
Cd 04 S	0,002	0,001	0,06	0,03
Cd 05 S	0,004	0,004	0,25	2
Cd 06 S	0,002	0,002	1	0,5
Cd 07 S	0,004	0,004	1	2
Cd 08 S	0,004	0,125	1	2
Cd 09 S	0,008	0,002	2	0,25
Cd 10 S	0,008	0,002	1	0,25
Cd 11 S	0,125	0,25	2	16
Cd 12 S	0,125	0,06	0,06	16
Cd 13 S	0,001	0,002	1	0,25
Cd 14 S	0,125	0,004	4	2
Cd 15 S	0,004	0,015	1	0,5
Cd 16 S	0,004	0,004	2	2
Cd 17 S	0,001	0,03	0,5	1
Cd 18 S	0,002	0,002	0,125	0,5
Cd 19 S	0,004	0,004	0,06	2
Cd 20 S	0,008	0,002	2	0,5
Cd 21 S	0,004	0,004	0,125	2
Cd 22 S	0,004	0,0005	1	0,5
Cd 23 S	0,004	0,001	2	0,5
Cd 24 S	0,002	0,004	0,125	2
Cd 25 S	0,004	0,001	16	2
Cd 26 S	0,004	0,002	0,06	16
Cd 27 S	0,008	0,5	8	16
Cd 28 S	0,004	0,015	2	32
Cd 29 S	0,06	0,25	4	2
Cd 31 S	0,004	0,015	0,5	1

APÊNDICE Q17017 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de anfotericina B combinadas com itraconazol em isolados de *Candida dubliniensis* resistentes ao fluconazol.

Excluído: Q

Isolados	CIM (µg/mL) Itraconazol		CIM (µg/mL) Anfotericina	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
Cd 01 R	128	64	1,00	0,125
Cd 02 R	128	32	1,00	0,125
Cd 03 R	64	64	2,00	0,125
Cd 04 R	128	128	1,00	0,500
Cd 05 R	128	128	2,00	0,030
Cd 06 R	128	64	1,00	0,060
Cd 07 R	128	128	1,00	0,500
Cd 08 R	128	128	1,00	0,125
Cd 09 R	128	128	2,00	0,030
Cd 10 R	32	256	1,00	0,500
Cd 11 R	128	128	0,50	0,250
Cd 12 R	64	128	0,50	4,000
Cd 13 R	64	256	0,25	0,500
Cd 14 R	64	128	2,00	0,500
Cd 15 R	128	128	2,00	0,015
Cd 16 R	128	128	1,00	0,500
Cd 17 R	128	128	2,00	0,030
Cd 18 R	128	128	0,25	2,000
Cd 19 R	64	256	1,00	0,250
Cd 20 R	128	512	1,00	0,125
Cd 21 R	64	32	0,25	0,500
Cd 22 R	512	128	1,00	0,250
Cd 23 R	128	512	1,00	0,125
Cd 24 R	64	32	0,25	0,500
Cd 25 R	64	16	1,00	0,250
Cd 26 R	64	128	1,00	0,250
Cd 27 R	256	128	0,50	0,030
Cd 28 R	128	128	1,00	0,250
Cd 29 R	128	64	1,00	0,500
Cd 31 R	512	128	2,00	0,250

APÊNDICE R18R18 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de anfotericina B combinadas com voriconazol em isolados de *Candida dubliniensis* resistentes ao fluconazol.

Excluído: R

Isolados	CIM (µg/mL) Voriconazol		CIM (µg/mL) Anfotericina	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
Cd 01 R	1	2	1,00	0,2500
Cd 02 R	0,25	2	1,00	0,0300
Cd 03 R	2	2	2,00	0,1250
Cd 04 R	2	4	1,00	0,0600
Cd 05 R	2	4	2,00	0,0150
Cd 06 R	4	0,5	1,00	0,0600
Cd 07 R	2	2	1,00	0,5000
Cd 08 R	2	8	1,00	0,0600
Cd 09 R	0,5	4	2,00	0,0300
Cd 10 R	1	2	1,00	0,0600
Cd 11 R	2	8	0,50	0,1200
Cd 12 R	2	16	0,50	16,000
Cd 13 R	4	2	0,25	4,0000
Cd 14 R	4	2	2,00	0,2500
Cd 15 R	4	4	2,00	0,1250
Cd 16 R	4	2	1,00	0,5000
Cd 17 R	8	2	2,00	0,0075
Cd 18 R	8	2	0,25	1,0000
Cd 19 R	16	8	1,00	0,5000
Cd 20 R	2	2	1,00	0,1250
Cd 21 R	2	1	0,25	0,5000
Cd 22 R	1	2	1,00	1,0000
Cd 23 R	0,5	0,5	1,00	0,0300
Cd 24 R	0,5	1	0,25	0,5000
Cd 25 R	0,5	8	1,00	0,2500
Cd 26 R	4	8	1,00	0,5000
Cd 27 R	2	0,5	0,50	0,0160
Cd 28 R	4	4	1,00	0,2500
Cd 29 R	2	2	1,00	0,5000
Cd 31 R	4	2	2,00	0,1250

APÊNDICE S19S19 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de terbinafina combinadas com itraconazol em isolados de *Candida dubliniensis* resistentes ao fluconazol.

Excluído: S

Isolados	CIM (µg/mL) Itraconazol		CIM (µg/mL) Terbinafina	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
Cd 01 R	128	128	128	0,5
Cd 02 R	128	64	64	0,5
Cd 03 R	64	32	128	0,5
Cd 04 R	128	512	128	1
Cd 05 R	128	512	128	1
Cd 06 R	128	512	256	0,5
Cd 07 R	128	512	128	1
Cd 08 R	128	512	128	0,5
Cd 09 R	128	512	128	1
Cd 10 R	32	64	128	0,5
Cd 11 R	128	64	128	0,5
Cd 12 R	64	32	64	1
Cd 13 R	64	32	128	0,5
Cd 14 R	64	64	64	1
Cd 15 R	128	64	128	0,5
Cd 16 R	128	64	256	0,25
Cd 17 R	128	32	256	0,125
Cd 18 R	128	32	256	0,125
Cd 19 R	64	32	256	0,125
Cd 20 R	128	32	256	0,25
Cd 21 R	64	32	256	0,125
Cd 22 R	512	32	128	0,25
Cd 23 R	128	32	256	0,125
Cd 24 R	64	32	128	0,25
Cd 25 R	64	16	256	0,125
Cd 26 R	64	64	256	0,125
Cd 27 R	256	32	128	0,25
Cd 28 R	128	128	128	0,5
Cd 29 R	128	32	256	0,25
Cd 31 R	512	32	256	0,125

APÊNDICE T20T20 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de terbinafina combinadas com voriconazol em isolados de *Candida dubliniensis* resistentes ao fluconazol.

Excluído: T

Isolados	CIM (µg/mL) Voriconazol		CIM (µg/mL) Terbinafina	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
Cd 01 R	1	4	128	128
Cd 02 R	0,25	1	64	32
Cd 03 R	2	4	128	128
Cd 04 R	2	2	128	32
Cd 05 R	2	2	128	128
Cd 06 R	4	1	256	128
Cd 07 R	2	2	128	64
Cd 08 R	2	2	128	128
Cd 09 R	0,5	1	128	32
Cd 10 R	1	4	128	128
Cd 11 R	2	1	128	512
Cd 12 R	2	2	64	256
Cd 13 R	4	4	128	128
Cd 14 R	4	4	64	512
Cd 15 R	4	2	128	128
Cd 16 R	4	2	256	128
Cd 17 R	8	4	256	128
Cd 18 R	8	1	256	128
Cd 19 R	16	1	256	128
Cd 20 R	2	2	256	64
Cd 21 R	2	1	256	32
Cd 22 R	1	2	128	64
Cd 23 R	0,5	0,5	256	32
Cd 24 R	0,5	1	128	16
Cd 25 R	0,5	4	256	32
Cd 26 R	4	2	256	128
Cd 27 R	2	0,5	128	64
Cd 28 R	4	2	128	128
Cd 29 R	2	1	256	64
Cd 31 R	4	1	256	128

APÊNDICE U21U21 - Interações resultantes da combinação de anfotericina B e itraconazol em *Candida dubliniensis*.

Excluído: U

Isolados	FIC _{ITC}	FIC _{AMB}	ICIF	Resultado	Isolados	FIC _{ITC}	FIC _{AMB}	ICIF	Resultado
Cd 01 S	7,50	4,00	11,50	antag	Cd 01 R	0,5	0,13	0,63	adit
Cd 02 S	8,33	0,50	8,83	antag	Cd 02 R	0,25	0,13	0,38	sinerg
Cd 03 S	15,63	1,00	16,63	antag	Cd 03 R	1	0,13	1,13	indif
Cd 04 S	1,88	1,00	2,88	indif	Cd 04 R	1	0,50	1,50	indif
Cd 05 S	8,33	1,00	9,33	antag	Cd 05 R	1	0,03	1,03	indif
Cd 06 S	15,63	0,50	16,13	antag	Cd 06 R	0,5	0,06	0,56	adit
Cd 07 S	8,33	1,00	9,33	antag	Cd 07 R	1	0,50	1,50	indif
Cd 08 S	2,00	1,00	3,00	indif	Cd 08 R	1	0,13	1,13	indif
Cd 09 S	0,13	0,03	0,17	sinerg	Cd 09 R	1	0,03	1,03	indif
Cd 10 S	0,12	0,06	0,18	sinerg	Cd 10 R	8	0,50	8,50	antag
Cd 11 S	0,24	0,06	0,30	sinerg	Cd 11 R	1	0,25	1,25	indif
Cd 12 S	0,53	1,00	1,53	indif	Cd 12 R	2	4,00	6,00	antag
Cd 13 S	3,75	0,06	3,81	indif	Cd 13 R	4	0,50	4,50	antag
Cd 14 S	0,25	0,12	0,37	sinerg	Cd 14 R	2	0,50	2,50	indif
Cd 15 S	0,12	0,24	0,36	sinerg	Cd 15 R	1	0,02	1,02	indif
Cd 16 S	0,12	1,00	1,12	indif	Cd 16 R	1	0,50	1,50	indif
Cd 17 S	0,50	0,06	0,56	adit	Cd 17 R	1	0,03	1,03	indif
Cd 18 S	1,00	1,00	2,00	indif	Cd 18 R	1	2,00	3,00	indif
Cd 19 S	0,25	1,00	1,25	indif	Cd 19 R	4	0,25	4,25	antag
Cd 20 S	1,00	0,24	1,24	indif	Cd 20 R	4	0,13	4,13	antag
Cd 21 S	0,12	0,48	0,60	adit	Cd 21 R	0,5	0,50	1,00	indif
Cd 22 S	0,27	0,24	0,51	adit	Cd 22 R	0,25	0,25	0,50	sinerg
Cd 23 S	0,53	0,24	0,77	adit	Cd 23 R	4	0,13	4,13	antag
Cd 24 S	1,00	0,50	1,50	indif	Cd 24 R	0,5	0,50	1,00	indif
Cd 25 S	0,25	1,00	1,25	indif	Cd 25 R	0,25	0,25	0,50	sinerg
Cd 26 S	0,25	4,17	4,42	indif	Cd 26 R	2	0,25	2,25	indif
Cd 27 S	0,50	0,50	1,00	indif	Cd 27 R	0,5	0,03	0,53	adit
Cd 28 S	8,33	0,12	8,45	antag	Cd 28 R	1	0,25	1,25	indif
Cd 29 S	0,25	0,50	0,75	adit	Cd 29 R	0,5	0,50	1,00	indif
Cd 31 S	0,50	0,25	0,75	adit	Cd 31 R	0,25	0,25	0,50	sinerg

Antagonismo (antag); Indiferença (indif); Aditividade (adit); Sinergismo (sinerg).

APÊNDICE V22V22 - Interações resultantes da combinação de anfotericina B e voriconazol em *Candida dubliniensis*.

Excluído: V

Isolados	FIC _{VRC}	FIC _{AMB}	ICIF	Resultado	Isolados	FIC _{VRC}	FIC _{AMB}	ICIF	Resultado
Cd 01 S	4,00	0,02	4,02	antag	Cd 01 R	2,00	0,25	2,25	indif
Cd 02 S	0,53	0,00	0,54	adit	Cd 02 R	8,00	0,03	8,03	antag
Cd 03 S	4,00	0,01	4,01	antag	Cd 03 R	1,00	0,13	1,13	indif
Cd 04 S	4,00	0,01	4,01	antag	Cd 04 R	2,00	0,06	2,06	indif
Cd 05 S	2,00	0,02	2,02	indif	Cd 05 R	2,00	0,02	2,02	indif
Cd 06 S	4,00	0,01	4,01	antag	Cd 06 R	0,13	0,06	0,19	sinerg
Cd 07 S	1,00	0,02	1,02	indif	Cd 07 R	1,00	0,50	1,50	indif
Cd 08 S	1,00	0,02	1,02	indif	Cd 08 R	4,00	0,06	4,06	antag
Cd 09 S	0,50	0,01	0,51	adit	Cd 09 R	8,00	0,03	8,03	antag
Cd 10 S	0,50	0,01	0,51	adit	Cd 10 R	2,00	0,06	2,06	indif
Cd 11 S	2,00	0,24	2,24	indif	Cd 11 R	4,00	0,12	4,12	antag
Cd 12 S	0,03	0,02	0,05	sinerg	Cd 12 R	8,00	16,00	24,00	antag
Cd 13 S	8,00	0,01	8,01	antag	Cd 13 R	0,50	4,00	4,50	antag
Cd 14 S	0,06	0,02	0,08	sinerg	Cd 14 R	0,50	0,25	0,75	adit
Cd 15 S	3,75	0,01	3,76	indif	Cd 15 R	1,00	0,13	1,13	indif
Cd 16 S	7,50	0,24	7,74	antag	Cd 16 R	0,50	0,50	1,00	indif
Cd 17 S	2,00	0,01	2,01	indif	Cd 17 R	0,25	0,01	0,26	sinerg
Cd 18 S	4,00	2,00	6,00	antag	Cd 18 R	0,25	1,00	1,25	indif
Cd 19 S	2,00	0,02	2,02	indif	Cd 19 R	0,50	0,50	1,00	indif
Cd 20 S	15,63	0,24	15,87	antag	Cd 20 R	1,00	0,13	1,13	indif
Cd 21 S	2,00	0,48	2,48	indif	Cd 21 R	0,50	0,50	1,00	indif
Cd 22 S	0,50	0,24	0,74	adit	Cd 22 R	2,00	1,00	3,00	indif
Cd 23 S	0,25	0,50	0,75	adit	Cd 23 R	1,00	0,03	1,03	indif
Cd 24 S	4,00	0,50	4,50	antag	Cd 24 R	2,00	0,50	2,50	indif
Cd 25 S	15,00	0,50	15,50	antag	Cd 25 R	16,00	0,25	16,25	antag
Cd 26 S	2,00	1,00	3,00	indif	Cd 26 R	2,00	0,50	2,50	indif
Cd 27 S	7,50	8,00	15,50	antag	Cd 27 R	0,25	0,02	0,27	sinerg
Cd 28 S	31,25	0,25	31,50	antag	Cd 28 R	1,00	0,25	1,25	indif
Cd 29 S	1,00	8,00	9,00	antag	Cd 29 R	1,00	0,50	1,50	indif
Cd 31 S	7,50	0,25	7,75	antag	Cd 31 R	0,50	0,13	0,63	adit

Antagonismo (antag); Indiferença (indif); Aditividade (adit); Sinergismo (sinerg).

APÊNDICE **W23W23**- Interações resultantes da combinação de terbinafina com itraconazol em *Candida dubliniensis*.

Excluído: W

Isolados	FIC _{ITC}	FIC _{TERB}	ICIF	Resultado	Isolados	FIC _{ITC}	FIC _{TERB}	ICIF	Resultado
Cd 01 S	7,50	0,25	7,75	antag	Cd 01 R	1,00	0,50	1,50	indif
Cd 02 S	2,00	4,00	6,00	antag	Cd 02 R	0,50	0,50	1,00	adit
Cd 03 S	15,63	32,00	47,63	antag	Cd 03 R	0,50	0,50	1,00	indif
Cd 04 S	1,88	33,33	35,21	antag	Cd 04 R	4,00	1,00	5,00	indif
Cd 05 S	2,00	8,00	10,00	antag	Cd 05 R	4,00	1,00	5,00	indif
Cd 06 S	3,75	4,00	7,75	antag	Cd 06 R	4,00	0,50	4,50	siner
Cd 07 S	4,00	4,00	8,00	antag	Cd 07 R	4,00	1,00	5,00	siner
Cd 08 S	2,00	8,00	10,00	antag	Cd 08 R	4,00	0,50	4,50	antag
Cd 09 S	0,13	2,00	2,13	antag	Cd 09 R	4,00	1,00	5,00	indif
Cd 10 S	0,12	0,50	0,62	antag	Cd 10 R	2,00	0,50	2,50	antag
Cd 11 S	0,06	1,00	1,06	antag	Cd 11 R	0,50	0,50	1,00	indif
Cd 12 S	8,33	33,33	41,67	antag	Cd 12 R	0,50	1,00	1,50	antag
Cd 13 S	3,75	1,00	4,75	antag	Cd 13 R	0,50	0,50	1,00	indif
Cd 14 S	2,08	0,50	2,58	antag	Cd 14 R	1,00	1,00	2,00	antag
Cd 15 S	0,24	2,00	2,24	antag	Cd 15 R	0,50	0,50	1,00	indif
Cd 16 S	0,48	4,00	4,48	antag	Cd 16 R	0,50	0,25	0,75	indif
Cd 17 S	2,00	8,00	10,00	antag	Cd 17 R	0,25	0,13	0,38	indif
Cd 18 S	2,00	32,00	34,00	antag	Cd 18 R	0,25	0,13	0,38	indif
Cd 19 S	0,50	16,67	17,17	antag	Cd 19 R	0,50	0,13	0,63	indif
Cd 20 S	2,00	1,00	3,00	antag	Cd 20 R	0,25	0,25	0,50	siner
Cd 21 S	0,06	4,00	4,06	antag	Cd 21 R	0,50	0,13	0,63	siner
Cd 22 S	1,00	2,00	3,00	antag	Cd 22 R	0,06	0,25	0,31	indif
Cd 23 S	1,00	0,50	1,50	antag	Cd 23 R	0,25	0,13	0,38	siner
Cd 24 S	0,27	16,00	16,27	antag	Cd 24 R	0,50	0,25	0,75	adit
Cd 25 S	0,13	0,06	0,20	antag	Cd 25 R	0,25	0,13	0,38	antag
Cd 26 S	0,50	33,33	33,83	antag	Cd 26 R	1,00	0,13	1,13	indif
Cd 27 S	1,00	4,00	5,00	antag	Cd 27 R	0,13	0,25	0,38	siner
Cd 28 S	16,67	2,00	18,67	antag	Cd 28 R	1,00	0,50	1,50	indif
Cd 29 S	1,00	8,00	9,00	antag	Cd 29 R	0,25	0,25	0,50	adit
Cd 31 S	0,50	2,00	2,50	antag	Cd 31 R	0,06	0,13	0,19	adit

Antagonismo (antag); Indiferença (indif); Aditividade (adit); Sinergismo (siner).

APÊNDICE X24X24 - Interações resultantes da combinação de terbinafina com voriconazol em *Candida dubliniensis*.

Excluído: X

Isolados	FIC _{VRC}	FIC _{TERB}	ICIF	Resultado	Isolados	FIC _{VRC}	FIC _{TERB}	ICIF	Resultado
Cd 01 S	0,50	0,13	0,63	adit	Cd 01 R	4,00	1,00	5,00	antag
Cd 02 S	0,53	4,00	4,53	antag	Cd 02 R	4,00	0,50	4,50	antag
Cd 03 S	20,00	4,00	24,00	antag	Cd 03 R	2,00	1,00	3,00	indif
Cd 04 S	0,50	0,50	1,00	indif	Cd 04 R	1,00	0,25	1,25	indif
Cd 05 S	1,00	8,00	9,00	antag	Cd 05 R	1,00	1,00	2,00	indif
Cd 06 S	1,00	0,50	1,50	indif	Cd 06 R	0,25	0,50	0,75	adit
Cd 07 S	1,00	2,00	3,00	indif	Cd 07 R	1,00	0,50	1,50	indif
Cd 08 S	31,25	2,00	33,25	antag	Cd 08 R	1,00	1,00	2,00	indif
Cd 09 S	0,25	0,13	0,38	sinerg	Cd 09 R	2,00	0,25	2,25	indif
Cd 10 S	0,25	0,25	0,50	sinerg	Cd 10 R	4,00	1,00	5,00	antag
Cd 11 S	2,00	8,00	10,00	antag	Cd 11 R	0,50	4,00	4,50	antag
Cd 12 S	0,48	266,67	267,5	antag	Cd 12 R	1,00	4,00	5,00	antag
Cd 13 S	2,00	0,25	2,25	indif	Cd 13 R	1,00	1,00	2,00	indif
Cd 14 S	0,03	0,50	0,53	adit	Cd 14 R	1,00	8,00	9,00	antag
Cd 15 S	3,75	0,50	4,25	antag	Cd 15 R	0,50	1,00	1,50	indif
Cd 16 S	1,00	1,00	2,00	indif	Cd 16 R	0,50	0,50	1,00	indif
Cd 17 S	30,00	2,00	32,00	antag	Cd 17 R	0,50	0,50	1,00	indif
Cd 18 S	1,00	4,00	5,00	antag	Cd 18 R	0,13	0,50	0,63	adit
Cd 19 S	1,00	33,33	34,33	antag	Cd 19 R	0,06	0,50	0,56	adit
Cd 20 S	0,25	0,25	0,50	sinerg	Cd 20 R	1,00	0,25	1,25	indif
Cd 21 S	1,00	16,00	17,00	antag	Cd 21 R	0,50	0,13	0,63	adit
Cd 22 S	0,13	0,50	0,63	adit	Cd 22 R	2,00	0,50	2,50	indif
Cd 23 S	0,25	0,25	0,50	sinerg	Cd 23 R	1,00	0,13	1,13	indif
Cd 24 S	2,00	16,00	18,00	antag	Cd 24 R	2,00	0,13	2,13	indif
Cd 25 S	0,25	0,13	0,38	sinerg	Cd 25 R	8,00	0,13	8,13	antag
Cd 26 S	0,50	266,67	267,1	antag	Cd 26 R	0,50	0,50	1,00	indif
Cd 27 S	62,50	2,00	64,50	antag	Cd 27 R	0,25	0,50	0,75	adit
Cd 28 S	3,75	16,00	19,75	antag	Cd 28 R	0,50	1,00	1,50	indif
Cd 29 S	4,17	0,50	4,67	antag	Cd 29 R	0,50	0,25	0,75	adit
Cd 31 S	3,75	2,00	5,75	antag	Cd 31 R	0,25	0,50	0,75	adit

Antagonismo (antag); Indiferença (indif); Aditividade (adit); Sinergismo (sinerg).

10 ANEXOS

10.1 Preparação dos meios de cultura

Ágar Sabouraud

Peptona	10,00 g
Dextrose	20,00 g
Ágar bacteriológico	15,00 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Adicionar o ágar à água destilada e aquecer até solubilização completa. Adicionar os outros componentes à mistura e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Caldo Sabouraud

Peptona	10,00 g
Dextrose	20,00 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Adicionar os componentes na água destilada e agitar com bastão de vidro até solubilização completa. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Ágar Níger/Gergelim

Dextrose	10,00 g
Creatinina	780 mg
Cloranfenicol	50 mg
Difenil	100 mg
Extrato de semente de níger ou gergelim	200 mL

Ágar bacteriológico	20,00 g
Água destilada	800 mL

Preparo do extrato de sementes:

Pesar 70g de sementes pulverizadas em almofariz com pistilo. Suspender em 350 mL de água destilada. Autoclavar a 121°C/ 10 min. Filtrar através de gaze e acondicionar em frasco limpo.

Ágar Alecrim

Dextrose	10,00 g
Creatinina	780 mg
Cloranfenicol	50 mg
Difenil	100 mg
Extrato de alecrim	200 mL
Ágar bacteriológico	20,00 g
Água destilada	800 mL

Preparo do extrato de alecrim:

Pesar 70g de folhas de alecrim e suspender em 350 mL de água destilada. Autoclavar a 121°C/ 10 min.

Ágar DRBC

Dextrose	10,00 g
Peptona bacteriológica	5,00 g
Cloranfenicol	0,05 g
Fosfato monobásico de potássio	1,00 g
Sulfato de magnésio pentahidratado	0,50 g
Rosa de bengala	0,025 g
Dicloran	0,002 g
Ágar bacteriológico	15,00 g
Água destilada	1000 mL

Dissolver os componentes em água destilada e aquecer até solubilização completa.
Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Ágar Suco de Tomate (V8)

Carbonato de cálcio	3,00 g
Ágar bacteriológico	15,00 g
Suco de tomate industrializado (V8)	200 mL
Água destilada	800 mL

Dissolver os componentes em água destilada e aquecer até solubilização completa.
Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Caldo Sabouraud Hipertônico

Peptona	10,00 g
Dextrose	20,00 g
Cloreto de sódio	65,00 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Adicionar os componentes na água destilada e agitar com bastão de vidro até solubilização completa. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Ágar Auxano

Sulfato de amônio	5,0 g
Fosfato de potássio monobásico	1,0 g
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,5 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada	1000 mL

Dissolver os componentes em água destilada e aquecer até solubilização completa.
Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Ágar Tween 80

Peptona bacteriológica	10,00 g
Cloreto de sódio	5,00 g
Cloreto de cálcio	0,10 g
Ágar bacteriológico	15,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Adicionar os componentes na água destilada e aquecer até solubilização completa. Após esterilização em autoclave a 121°C/15 min e resfriamento (45-50°C), adicionar 5 mL de Tween 80 estéril e distribuir 25 mL em cada placa de Petri.

Caldo “Yeast Carbon Base” acrescido de vitaminas, glicose e albumina bovina (meio de indução de proteinases)

“Yeast Carbon Base”	1,17 g
Albumina bovina	0,02 g
Dextrose	0,02 g
Protovit (polivitamínico)	0,25 mL
Água destilada q.s.p.	100 mL

Adicionar os componentes na água destilada e agitar com bastão de vidro até solubilização completa. Ajustar o pH para 5,6 e esterilizar por filtração em membrana Millipore 0,22 µm.

Caldo YEPD

Peptona	20,00 g
Dextrose	20,00 g
Extrato de levedura	10,00 g
Tampão ácido cítrico-fosfato	1000 mL

Dissolver os componentes no tampão e agitar com bastão de vidro até solubilização completa. Esterilizar a 121°C/15 min.

Ágar YEPD

Peptona	20,00 g
Dextrose	20,00 g
Extrato de levedura	10,00 g
Azul de metileno	30 mg
Ágar bacteriológico	20,00 g
Tampão ácido cítrico-fosfato	1000 mL

Dissolver os componentes no tampão e aquecer até solubilização completa. Esterilizar a 121°C/15 min.

Meio RPMI 1640

RPMI 1640 em pó (com glutamina e vermelho de fenol, sem bicarbonato)	10,40 g
MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico)	34,53 g
Dextrose	20,00 g

Dissolver o meio em pó em 900 mL de água destilada. Acrescentar o MOPS (concentração final de 0,165 mol/L) e a dextrose, agitando até dissolver. Ajustar o pH para 7,0. a 25°C, utilizando hidróxido de sódio 1 mol/L. Acrescentar água destilada adicional para completar o volume de 1000 mL. Esterilizar por filtração e armazenar a 4°C.

10.2 Preparação das soluções

Tampão PBS

Cloreto de potássio	0,20 g
---------------------------	--------

Fosfato monobásico de potássio	0,20 g
Cloreto de magnésio	0,047 g
Fosfato dibásico de sódio	1,15 g
Cloreto de sódio	8,00 g
Água destilada	1000 mL

Adicionar os componentes na água destilada e agitar com bastão de vidro até solubilização completa. Autoclavar a 121° por 15 minutos.

Tampão ácido cítrico-fosfato

Ácido cítrico	19,20 g
Fosfato de potássio dibásico	34,80 g
Água destilada	1000 mL

Adicionar os componentes na água destilada e agitar com bastão de vidro até solubilização completa. Ajustar o pH para 4,5.