



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**ATIVIDADE DE NOVOS ANTIFÚNGICOS SOBRE**  
***Candida spp. E Cryptococcus neoformans***

---

**Cláudia Sala Andrade**

**PPGCTF**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2004**

**ATIVIDADE DE NOVOS ANTIFÚNGICOS SOBRE**  
***Candida spp. E Cryptococcus neoformans***

---

**por**

**Cláudia Sala Andrade**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia Farmacêuticas Nível Mestrado, Área de  
Concentração de Controle e Desenvolvimento de Produtos e  
Insumos Farmacêuticos da Universidade Federal de Santa  
Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do  
grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas.**

**PPGCTF**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2004**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia  
Farmacêuticas**

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

**ATIVIDADE DE NOVOS ANTIFÚNGICOS SOBRE  
*Candida spp.* E *Cryptococcus neoformans***

elaborada por  
**Cláudia Sala Andrade**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Sydney Hartz Alves**  
(Presidente/Orientador)

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Melânia Palermo Manfron**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Trevisan Beck**

Santa Maria, 19 de agosto de 2004

**sem ser isso,  
esta vindima de perguntas  
eu não teria estas páginas**

**sem pisar meus não saberes  
mergulhar em suas essências  
não beberia minhas descobertas**

**hoje,  
bebo a safra dos últimos anos  
uma mistura de tudo o que fui e não fui  
do que fiz e não fiz  
do que sou e não sou**

**hoje,  
lhes convido a beber comigo  
- mais do que isso  
a ceifar a sede de agora**

**deixo aqui este pouco de mim  
mas já semeio novas plantas**

**permanecer cultivando  
permanecer colhendo  
reinventando a mim mesma**

**Seria a ciência  
algo além  
de cultivar a vida?**

**Rogério Silva**

Dedico esta conquista

ao meu esposo

*Amarildo Andrade*

e aos nossos filhos,

*Mariana, Gabriela e Lucas*

Pelo amor presente em nossas vidas.

## AGRADECIMENTOS

*Amarildo, Mariana, Gabriela e Lucas*, pelo amor, carinho, paciência e cuidado; pela compreensão diante de tantas horas de ausência; pelo apoio e respeito a esta fase de minha vida e por fazerem dela razão para ser vivida.

Aos meus pais, *Bruno e Lurdinha*, que sempre estiveram presentes nos momentos importantes de minha vida, pelo exemplo de vida, amor e fé que me incentivou e me fez acreditar!

À querida *Vó Luiza*, que aos 90 anos, é exemplo de vida repleta de fé, amor, coragem e conselhos, os quais me fortalecem em todos os momentos.

Aos meus irmãos, *Márcia, Simone, Júnior e Fernanda*, meus cunhados e sobrinhos, por serem sempre presentes e imprescindíveis em minha vida.

À *UFMS* – Universidade Federal de Santa Maria e ao *HUSM* – Hospital Universitário de Santa Maria, pela oportunidade oferecida.

Ao meu orientador Prof. Dr. *Sydney Hartz Alves*, pela acolhida, amizade, paciência, orientação e oportunidade de ampliar meus conhecimentos, vencendo mais esta etapa no meu crescimento profissional.

A minha grande amiga *Maria do Carmo*, pelo desprendimento, estímulo, carinho e ajuda constante, as quais foram imprescindíveis para concluir esta jornada. Esta conquista também é sua!

Aos *colegas, bolsistas e amigos* do Serviço de Farmácia do HUSM, pelo apoio e compreensão, viabilizando a realização deste trabalho. Especial referência ao amigo *Luiz Grassi Padilha*, pela amizade, apoio incondicional, disposição, assumindo minhas tarefas quando ausente; e às farmacêuticas *Vera Lúcia Toescher, Margarete Giacomini, Solange Soares, Stella Nuccia da Silva, e Solange Reis* pelo incentivo e amizade.

Às bolsistas do LAPEMI, *Liliane Alves Schid, Joseane Faganello, Carolina Silveira, Joseane Griebeler*, e a servidora *Sandra Fontana*, pelo auxílio na parte prática deste trabalho.

Aos meus *colegas e amigos do mestrado*, pelo auxílio, apoio e amizade, em especial a *Julie Milano e Lisone Morsch*.

À querida amiga *Elaide Minato*, pela dedicação, carinho e por ter dado o estímulo e a força necessária para eu chegar à reta final.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação, pelos conhecimentos adquiridos e pela amizade, com referência especial ao

Prof. Dr. *Augusto Bortoluzzi*, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> *Margarete Athayde*, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> *Melânia Manfron*.

Aos amigos que estiveram presentes de alguma forma, nas várias etapas desta caminhada, meu agradecimento pelo carinho, pelas palavras de conforto e apoio, pela amizade incondicional, por compartilharem comigo os momentos de alegrias e ansiedade: *Valério de Melo Silva*, *Cláudia Brum Drews*, *Luciana Mozzaquatro*, *Vânia Durgante*, *Janete Denardin*, *Maria Clara Valadão*, *Maria de Lourdes Giacomini*, *Sandra Márcia Schimidt*, *Rogério Silva*, *Jaime Milman*, *Christiane Marchesan*, *Adriana Barbosa*, *Loriene Hoff*, *Alexandre Vargas*, e a todos aqueles que aqui não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu Muito Obrigado!



## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE REDUÇÕES.....	xiii
RESUMO .....	xv
ABSTRACT .....	xvi
INTRODUÇÃO .....	1
1 OBJETIVOS .....	3
1.1 Objetivo geral .....	3
1.2 Objetivo específico .....	3
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	4
2.1 Os fungos .....	4
2.1.1 A virulência dos fungos .....	5
2.2 O gênero <i>Candida</i> .....	6
2.2.1 As candidíases .....	7
2.3 <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	17
2.3.1 Ecologia de <i>C. neoformans</i> .....	20
2.3.2 Criptococose .....	21
2.4 Evolução e características dos agentes antifúngicos .....	28
2.4.1 Os azóis .....	32
2.4.2 Resistência do <i>Cryptococcus neoformans</i> aos agentes antifúngicos .....	42
2.5 Novos agentes antifúngicos .....	44
2.5.1 Albaconazol .....	44
2.5.2 Ravuconazol .....	46
2.5.3 Micafungina .....	48
2.6 Provas de suscetibilidade com antifúngicos <i>in vitro</i> .....	51
2.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	51
2.6.2 Técnica atualmente preconizada .....	52

3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	54
3.1	Microorganismos .....	54
3.1.1	Procedência .....	54
3.1.2	Isolamento e identificação .....	55
3.1.3	Seleção das leveduras .....	55
3.2	Meios de cultura .....	55
3.2.2	Meios de cultura utilizados para o isolamento de leveduras .....	56
3.2.3	Meio de cultura utilizado para manutenção das cepas de leveduras isoladas .....	56
3.3	Manutenção das culturas e preparação dos inóculos .....	60
3.4	Identificação das amostras.....	61
3.4.1	Características micromorfológicas.....	61
3.4.2	Formação de tubos germinativos.....	61
3.4.3	Produção de ascóporos.....	61
3.4.4	Pigmentação de <i>C. neoformans</i> .....	62
3.4.5	Deteção da cápsula polissacarídica.....	62
3.4.6	Características bioquímicas.....	63
3.4.7	Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio.....	63
3.4.8	Assimilação de nitrato .....	64
3.4.9	Produção de urease .....	65
3.4.10	Determinação das variedades de <i>C. neoformans</i> .....	65
3.5	Testes de suscetibilidade (NCCLS M27-A, 1997).....	65
3.5.1	Soluções estoques dos agentes antifúngicos.....	65
3.5.2	Diluição, distribuição e controle dos agentes antifúngicos.....	67
3.5.3	Preparação do inóculo.....	67
3.5.4	Execução da prova.....	68
3.5.5	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	68
3.5.6	Pontos de corte para definição da sensibilidade e resistência dos isolados (NCCLS, M27 – A).....	69
3.6	Análise estatística.....	67
4	RESULTADOS .....	71
4.1	Testes de suscetibilidade a antifúngicos .....	71
4.1.1	Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> frente ao fluconazol ..	71
4.1.2	Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> frente ao ravuconazol	73
4.1.3	Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> frente ao albaconazol	74
4.1.4	Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> frente à micafungina .	75
4.1.5	Suscetibilidade de <i>Cryptococcus neoformans</i> de origem clínica e ambiental, frente ao fluconazol .....	76
4.1.6	Suscetibilidade de <i>Cryptococcus neoformans</i> , de origem clínica e ambiental, frente ao ravuconazol .....	77
5	DISCUSSÃO .....	79
5.1	Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> frente ao fluconazol.....	80

5.2 Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> frente ao ravuconazol.....	81
5.3 Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> frente ao albaconazol.....	83
5.4 Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> frente à micafungina .....	84
5.5 Suscetibilidade de <i>C. neoformans</i> frente ao fluconazol.....	86
5.6 Suscetibilidade de <i>C. neoformans</i> frente ao ravuconazol....	88
5.7 Considerações finais.....	89
CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Características das espécies de <i>Candida spp</i> não <i>albicans</i> .....	14
TABELA 2 -	Pontos de corte .....	69
TABELA 3 -	Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> frente ao fluconazol (CIMs/%) .....	72
TABELA 4 -	Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> frente ao ravuconazol (CIMs/%) .....	73
TABELA 5 -	Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> frente ao albaconazol (CIMs/%) .....	74
TABELA 6 -	Suscetibilidade de <i>Candida spp</i> frente à micafungina (CIMs/%) .....	75
TABELA 7 -	Suscetibilidade e resistência das espécies de <i>Candida</i> frente aos antifúngicos testados.....	76
TABELA 8 -	Suscetibilidade de <i>Cryptococcus neoformans</i> , de origem clínica e ambiental, frente ao fluconazol (CIMs/%) .....	77
TABELA 9 -	Suscetibilidade de <i>Cryptococcus neoformans</i> , de origem clínica e ambiental, frente ao ravuconazol (CIMs/%) .....	78
TABELA 10 -	Perfis de suscetibilidade de <i>Cryptococcus neoformans</i> , de origem clínica e ambiental, frente aos antifúngicos testados.....	78

## LISTA DE REDUÇÕES

$\mu$	micrôn
$\mu\text{m}$	micrômetro
14 DM	14- $\alpha$ -desmetilase
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
CGB	Ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
g	grama
GXM	Glicuroxilomanana
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
Kg	kilograma
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fosfato de potássio
$\text{KNO}_3$	nitrato de potássio
MFS	Major facilitador superfamily
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro

MOPS	3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato sódico dibásico
NaHPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PDR	Pleiotropic drug resistance
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
UV	Ultravioleta

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### ATIVIDADE DE NOVOS ANTIFÚNGICOS SOBRE *Candida spp.* E *Cryptococcus neoformans*

AUTOR: CLÁUDIA SALA ANDRADE  
ORIENTADOR: SYDNEY HARTZ ALVES  
Santa Maria, 19 de agosto de 2004

As infecções fúngicas têm-se tornado uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes, principalmente os imunocomprometidos. Na tentativa de se transpor esta realidade, têm-se buscado estabelecer e avaliar novas drogas antifúngicas eficazes e com melhor tolerabilidade e segurança. O presente estudo foi objetivado a verificar a atividade dos triazólicos fluconazol, ravuconazol e albaconazol e da micafungina, frente a um banco de fungos leveduriformes incluindo as espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata* e *C. krusei*, todas de origem clínica e *Cryptococcus neoformans* de origens clínica e ambiental. De modo geral, as espécies de *Candida spp.* e *Cryptococcus* foram sensíveis aos antifúngicos testados, com exceção da *Candida albicans* e *Candida tropicalis* frente ao fluconazol, onde 6,6% e 3,3%, respectivamente dos isolados, foram resistentes a este azólico. Estes resultados demonstram a necessidade de uma constante vigilância da suscetibilidade dos fungos e maiores pesquisas em relação às drogas antifúngicas, pois, desta forma, estaremos contribuindo para a menor morbidade e maior sobrevida dos pacientes.

**Palavras-chaves:** *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, drogas antifúngicas

## **ABSTRACT**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **ATIVIDADE DE NOVOS ANTIFÚNGICOS SOBRE *Candida spp.* E *Cryptococcus neoformans***

AUTOR: CLÁUDIA SALA ANDRADE  
ORIENTADOR: SYDNEY HARTZ ALVES  
Santa Maria, 19 de agosto de 2004

The fungal infections are becoming an important cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients. Here we have studied the activity of new antifungal agents as ravuconazole, albaconazole, micafungin as well as fluconazole tpathogenic yeasts as *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitaniae*, *Candida glabrata* and *Candida krusei*. We have also included clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans*. The susceptibilities tests indicated that the majority of the strains were sensible to the antifungal agents studied but *Candida albicans* (6.6%) and *C.tropicalis* (3.3%) were classified as resistant to fluconazole. These results show the importance of monitoring of the susceptibility in yeast like fungi from clinical source and emphasize that new and constant susceptibility studies deserve be applied to *Candida* and *Cryptococcus neoformans* to reduce the mortality among immunocompromised patients.

**Key-words:** *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *antifungal agents*



## INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas têm se tornado uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos, principalmente os que apresentam fatores predisponentes para tal complicação como neutropênicos, portadores de câncer, SIDA, internados em terapia intensiva, submetidos a antibioticoterapia de amplo espectro, portadores de cateteres venosos centrais, transplantados de órgãos sólidos e de medula óssea e nutrição parenteral (NEUFELD, 2003; MENDES-GIANNINI & MELHEM, 1996).

O aumento da frequência e severidade das micoses sistêmicas, mesmo quando adequadamente tratadas e o surgimento de novas formas clínicas de processos fúngicos não descritos na literatura, e a incidência crescente de infecções fúngicas oportunistas, levam a um maior e indiscriminado uso de antifúngicos sistêmicos (NUCCI, 2003).

Na tentativa de se transpor todas essas circunstâncias adversas, têm-se buscado estabelecer e avaliar novas drogas antifúngicas, eficazes e com melhor tolerabilidade e segurança. Por isto, dois caminhos principais têm sido seguidos:

- desenvolvimento de análogos das classes de drogas existentes, como por exemplo, as novas gerações de derivados triazólicos como albaconazol e ravuconazol;

- a identificação de sítios específicos na célula fúngica e o desenvolvimento de drogas que interfiram em suas funções, tais como, equinocandinas (micafungina) (NEUFELD, 2003; MAERTENS, 2004);

Entre as infecções oportunistas, espécies dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* têm sido os mais documentados nos diferentes tipos de pacientes com quebra de mecanismo de defesa (ALVES et al., 1997; RICHARDSON & WARNOCK, 1993).

As infecções por *Candida spp* tornaram-se problema de saúde pública em diferentes centros em todo o mundo, principalmente devido ao fenômeno da resistência, inicialmente novo, que passou a freqüente em espécies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, e o aparecimento de espécies novas como *C. dublinienses* (NUCCI, 2003; COLOMBO, 2003; SANGLARD et al., 1995).

O *C. neoformans*, ataca preferencialmente pacientes imunodeprimidos, principalmente com SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) que desenvolvem formas clínicas sistêmicas, sobretudo meningoencefalia (MITCHELL & PERFECT, 1995; CHERNIAK & SUNDSTROM, 1994).

No tratamento das infecções fúngicas o antifúngico ideal deve ser de amplo espectro, atóxico, com atividade oral e parenteral, sem resistências, com farmacocinética adequada e de baixo custo (NEUFELD, 2003; BODEY, 1993).

Partindo deste contexto a presente pesquisa buscou verificar a suscetibilidade e a resistência de leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus* frente a antifúngicos de uso freqüente bem como frente a novas opções terapêuticas.

# 1 OBJETIVOS

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a atividade de novos triazólicos e da micafungina, frente a um banco de fungos leveduriformes do gênero *Candida* e do gênero *Cryptococcus*.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a atividade antifúngica do fluconazol sobre isolados de *Candida spp* e *Cryptococcus* de origem clínica e ambiental.
- Verificar a atividade antifúngica do albaconazol sobre isolados de *Candida spp*.
- Verificar a atividade antifúngica do ravuconazol sobre isolados de *Candida spp* e de *Cryptococcus* de origem clínica e ambiental.
- Verificar a atividade antifúngica da micafungina sobre isolados de *Candida spp*.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 OS FUNGOS**

Os organismos vivos estão divididos em 5 reinos sendo um deles o reino dos fungos. Os fungos podem ser compreendidos como um grupo diverso de organismos eucarióticos, que apresentam núcleo, nucléolos individualizados, mitocôndrias, vacúolos, têm parede definida e rígida, composta de quitina, celulose ou betaglicano e não possuem clorofila (JAWETZ, 1992).

A classificação e a identificação dos fungos baseiam-se na sua morfologia e nas suas diferenças nutricionais e bioquímicas. Morfologicamente os fungos podem apresentar-se de modo macroscópico (cogumelos) e fungos microscópicos, mas visíveis a olho nú (bolores ou leveduras). A microscopia ótica revela os microfungos com a presença de hifas, cujos conjuntos formam micélios (MENDES-GIANNINI & MELHEM, 1996).

Os fungos são geralmente aeróbicos estritos, mas algumas leveduras, entretanto são microaerófilas ou anaeróbias facultativas. A reprodução sexuada ocorre exclusivamente em ambiente rico em oxigênio, fazendo com que sejam considerados perfeitos ou verdadeiros. Fungos imperfeitos possuem reprodução exclusivamente assexuada sendo representados pelas leveduras (BODEY, 1993).

O fenômeno dimórfico dos fungos pode ser evidenciado *in vitro* e *in vivo*, dependendo das condições do meio ambiente em que se encontram. Ao invadirem os tecidos os fungos filamentosos sofrem uma redução morfológica. Este dimorfismo está caracterizado por apresentar no meio ambiente formas filamentosas, e nos tecidos infectados leveduras. Estes fenômenos *in vitro*, ocorrem com o desenvolvimento de formas filamentosas (micélio) entre 22-28°C e das leveduriformes entre 35-37°C. Com exceção de *C. albicans* e *Malassezia furfur*, que são hóspedes normais do homem, os demais fungos patogênicos vivem como saprófitas na natureza. Os fungos patogênicos penetram por via inalatória ou por implantação transtegumentar (VERONESI, 2002).

Das milhares de espécies de fungos descritos na literatura (50.000 a 250.000) menos de duzentos têm sido associados a doenças humanas (RICHARDSON & WARNOCK, 1993).

### **2.1.1 A virulência dos fungos**

A virulência dos fungos é definida como sua capacidade quantitativa de provocar doenças, e inúmeros fatores aumentam esta virulência: temperatura, pH, fatores de defesa do hospedeiro e predisposição genética, presença de fatores que aumentam a dispersão (cápsula, componentes da parede celular, produção de enzimas e/ou toxinas, variedade e tipos de acasalamentos, crescimento intracelular, doença de base e administração de medicamentos, variações na suscetibilidade a determinados agentes) (MURPHY et al., 1993).

Os fungos podem ter várias classificações. De acordo com a patogenicidade podem ser não patogênicos, patogênicos primários ou

facultativos e por fungos patogênicos oportunistas. Patogênicos são os que têm capacidade de invadir os tecidos de um hospedeiro normal; os oportunistas são invasores de tecidos de indivíduos com alterações graves do sistema imunodefensivo do organismo (KWON-CHUNG, 1994; VERONESI, 2002).

Micose é o nome dado às doenças causadas pelos fungos. Quanto ao sítio inicial da infecção podem ser micoses superficiais, subcutâneas e sistêmicas (VERONESI, 2002).

Com o aprimoramento do diagnóstico e a maior suscetibilidade da população, tem aumentado o número de infecções causadas por fungos e a variedade de fungos responsáveis por estas.

## **2.2 O GÊNERO *Cândida***

O gênero *Candida* pertence ao filo dos fungos imperfeitos, ordem Cryptococcales e família Cryptococacea (MANDELL, 1991).

Entre as infecções fúngicas invasivas, a literatura demonstra grande prevalência do gênero *Candida* como causa de infecções hospitalares, sendo assim, *Candida spp* tornou-se um patógeno nosocomial comum (BODEY, 1993).

O gênero *Candida* compreende mais de 200 espécies, das quais cerca de 20 já foram associadas a processos infecciosos. Dentre estas espécies a *C. albicans* é o microorganismo mais comumente implicado (Pfaller *et al*, 1999). As espécies não-*albicans* mais freqüentemente reconhecidas como patógenos são: *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*,

*C. krusei* e *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. guillhermondii* (RICHARDSON & WARNOCK, 1993; DIGNANI et al., 2003).

As manifestações clínicas dos processos infecciosos causados por *Candida albicans* são várias. Este organismo é parte integrante da microbiota humana, e pode ser causa de manifestações fúngicas oportunistas. A maioria dos estudos indica que pelo menos em 60% dos casos de infecção ela está envolvida (BODEY, 1993; COLIN et al., 1999).

*C. albicans* é uma levedura gram-positiva evidenciando hifas e pseudohifas. São organismos aeróbios, capazes de desenvolver pseudofilamentos e produzir clamidósporos (tipo de esporo assexuado). Este é capaz de produzir hifas verdadeiras e uniformemente largas que crescem por alongamento apical e formam blocos em ângulos retos com esporos revestidos de membrana. As pseudohifas são formadas com brotos que se alongam e continuam conectadas, sendo estas mais largas que as hifas verdadeiras, tendo constrições nos sítios de união. Seu diâmetro varia entre 3-6  $\mu$  de diâmetro, de forma oval e paredes delgadas. Observam-se brotos originados denominados pseudohifas, às vezes se observam formas largas com grupos celulares (blastosporos) nas constrições (JAWETZ, 1992).

## **2.2.1 As candidíases**

### 2.2.1.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos de diferentes espécies de *Candida*

O homem é o reservatório do gênero *Candida*. Não há predileção por sexo ou idade, constituindo em 25% das micoses superficiais

(ABRAHAMSEN et al., 1992; BORG & RUCHEL, 1988). Fungos, em geral, não induzem enfermidades, vivem em equilíbrio com outros microorganismos no corpo, existindo como uma colônia ou comensal saprófita (CHACKRABARTI, NAYAR & TALWAR, 1991; CHANDRESEKAR & GATNY, 1994). Estes microorganismos são comensais normais do ser humano, se encontram na pele enferma, ao longo do trato gastrointestinal, na expectoração, no trato genital, na urina, cavidade bucal (BORG & RUCHEL, 1988; DE GREGORIO, LEE & RIES, 1982). Quando diversos fatores alteram este equilíbrio como fármacos, transtornos ou infecções por vírus como HIV ou uma fonte endógena, assumem o papel de patógeno e causam manifestações clínicas notórias. Podem ocorrer em pessoas que têm alterado os mecanismos de defesa do organismo (CHACKRABARTI, NAYAR & TALWAR, 1991; GALGIANI et al., 1992), sendo impressionantes as taxas de mortalidade e morbidade destes pacientes que em sua maioria estão hospitalizados.

As enfermidades micóticas não são geralmente transmissíveis. Podem ter transmissão entre companheiros sexuais, através das mãos de profissionais de saúde e durante o nascimento aonde a infecção vai desde a vagina à orofaringe (BARCHIESI et al., 1994).

A candidíase é infecção primária ou secundária, aguda ou crônica, envolvendo membros do gênero *Candida* (MENDES-GIANNINI & MELHEM, 1996). Candidíases emergiram como um problema médico significativo ao término do século XX, pela prevalência das infecções oportunistas em pacientes infectados com vírus HIV e em outros casos clínicos de imunossupressão (SIDRIM & MOREIRA, 1998; GROLL et al., 1998); e infecções superficiais ainda continuam infestando o hospedeiro normal, especialmente em climas quentes. A frequência de *Candida spp* não *albicans* está aumentando, porém a *Candida albicans* é ainda o maior patógeno (NGUYEN et al., 1996; GROLL et al., 1998).



O sistema de defesa do hospedeiro possui vários componentes, capazes de protegê-lo contra uma infecção por *Candida* principalmente de *C. albicans* tais como pele e mucosa, evitando assim infecções de microorganismos formadores de colônias e que possuem a propriedade de aderência. Ao que parece *C. albicans* e *C. tropicalis*, são as espécies mais aderentes ao hospedeiro. Os leucócitos polimorfonucleares, monócitos e flora microbiana normal também constituem defesas orgânicas normais, porém quando o equilíbrio sistêmico é alterado como ocorre em imunossupressões, o fungo rapidamente começa sua proliferação estimulando a resposta tissular do hospedeiro que pode variar bastante (VERONESI, 2002).

Os principais fatores envolvidos na manifestação da candidíase são: SIDA, cirurgias, imunossupressão iatrogênica, cateteres intravenosos, agentes antimicrobianos administrados por longos períodos, quimioterapia citorrredutora, neutropenia, doenças hematológicas, queimaduras e drogas injetáveis. Em pacientes com SIDA, quase todas as infecções são causadas por *C. albicans* (VERONESI, 2002; RICHARDSON E WARNOCK, 1993).

As manifestações clínicas das candidíases são extremamente variadas. Estas manifestações atingem a superfície cutânea ou membranas mucosas, resultando em candidíase oral, candidíase vaginal, intertrigo, paroníquia e onicomicose. Elas também podem ser sistêmicas como na septicemia, nas endocardites e meningites.

A forma mais comum de candidíase oral é pseudomembranosa, caracterizada por placas brancas removíveis na mucosa oral (aftas). Outra apresentação clínica é a forma atrófica, que se apresenta como placas vermelhas, lisas, sobre o palato duro ou mole. O intertrigo atinge mais freqüentemente as dobras cutâneas, nuca, virilha e regiões axilares (RICHARDSON & WARNOCK, 1993).

Entre as espécies de *Cândida*, encontradas na cavidade oral, *C. albicans* é a mais freqüente (70%), seguida de *C. tropicalis* (6,7%), *C. glabrata* (6,6%), *C. parapsilosis* (1,9%), *C. krusei* (1,7%), *C. guilliermondii* (0,4%) (MENDES-GIANNINI & MELHEM, 1996).

A infecção mucocutânea crônica pode estar associada com doenças endócrinas, como diabetes *melittus*, tratamento com antibióticos de amplo espectro ou imunodeficiência, sendo freqüente na infecção por HIV (QUINDÓS, 2002).

Candidíase disseminada ocorre em recém-nascidos de baixo peso e hospedeiros imunocomprometidos, podendo atingir qualquer órgão e evoluir para êxito letal. A disseminação hematogênica pode ocorrer em pacientes neutropênicos, conseqüente ao uso de sondas gástricas ou catéteres intravasculares, atingindo diversos órgãos ou prótese valvular cardíaca (QUINDÓS, 2002; MURPHY et al., 1993).

As complicações causadas por *Candida* em infecções de corrente sangüínea são de duas ordens. A primeira delas, bastante conhecida, é documentada durante o período de permanência do paciente no hospital: a prorrogação do tempo de internação e mortalidade. A identificação de *Candida* no sangue é um marcador de óbito, visto que, cerca de 60% dos que desenvolvem candidemia falecem e em 40% deles a morte é diretamente associada a sepse por *Candida*. Os 20% restantes estão relacionados à gravidade das doenças de base. O outro tipo de complicação ocorre mais tardiamente, após a alta do paciente que passou por um período prolongado de internação. Freqüentemente pacientes retornam aos consultórios com quadros de retinite, osteomielite ou meningite por *Candida*, episódio este que se estabelece semanas ou mesmo meses após a ocorrência da candidemia (COLOMBO, 2003).

As doenças fúngicas invasivas são cada vez mais freqüentes no ambiente hospitalar, em decorrência do aumento de pacientes imunocomprometidos. Podemos relacionar este fenômeno ao uso abusivo de antimicrobianos e o grande número de procedimentos invasivos os quais são submetidos os referidos pacientes (ANDRIOLE, 1999).

Dentre os maiores fatores que predispõe pacientes para invasão sistêmica fúngica incluem: neutropenia prolongada (indução de quimioterapia); defeito na função do linfócito-T (associado com transplante de órgãos e infecção HIV); função macrófago deficiente (associado com altas doses e prolongada administração de corticosteróides); e defeitos de barreira (associados com procedimentos médicos invasivos cateteres vasculares, nutrição parenteral e hemodiálise e diálise peritoneal) (QUINDÓS, 2002).

#### 2.2.1.2 *Candida albicans*

Métodos de tipagem têm sido desenvolvidos para diferenciação fenotípica e genotípica de *C. albicans*. Os resultados mostram, com poucas exceções, que indivíduos carregam o mesmo tipo de *C. albicans* em diferentes sítios anatômicos; da mesma forma, os mesmos biotipos estão associados a sintomas clínicos de vaginite e em secreções de mulheres sem sintomatologia. O mesmo foi demonstrado em estudos de candidíase oral e esofagiana em paciente com SIDA. No caso de candidíase vaginal recorrente, os mesmos tipos têm sido isolados e, em casos de candidíase sistêmica, estes são iguais aos isolados de infecções fúngicas superficiais (NUCCI et al., 1999).

Através de estudos de biotipagem, verifica-se também que a candidíase sistêmica de origem hospitalar não é causada por uma única cepa de *C. albicans*. *C. albicans* tem dois principais sorotipos A e B. A freqüência do sorotipo A é maior na população mundial. O sorotipo B tem sido descrito com maior freqüência em cepas obtidas de paciente com SIDA (MENDES-GIANNINI & MELHEM, 1996).

Há relatos como os estudos realizados e avaliados por Panagakos e cols, onde certificam que nas fontes de água, que suprem as unidades odontológicas, é freqüente ver colônias de *Candida albicans* e nos equipamentos com higiene e manutenção deficientes (BODEY, 1993), correlacionando a candidíase a precários fatores de higiene e saúde geral (ABRAHAMSEN et al., 1992).

A população de leveduras no trato gastrointestinal é ainda mais elevada no estômago e intestino; aqui também *C. albicans* é a levedura isolada. A presença de leveduras na vagina tem sido extensivamente estudada e a freqüência destas em mulheres aparentemente normais é menor do que 30%. Por outro lado, o uso de antibióticos, contraceptivos hormonais e estágios do ciclo menstrual, considerados tradicionalmente fatores importantes, não se correlacionam diretamente com o número de leveduras. Encontra-se maior freqüência de leveduras em mulheres grávidas no terceiro trimestre de gravidez, caindo rapidamente após o parto, sugerindo que fatores fisiológicos relacionados com a gravidez predisõem o epitélio vaginal à colonização fúngica (MENDES-GIANNINI & MELHEM, 1996).

As concentrações de progesterona e estradiol, pH vaginal, concentração de glicogênio vaginal são condições propícias ao desenvolvimento de *Candida*. A *C. albicans* é a levedura mais freqüente em grupos de mulheres sem sintomatologia aparente, assim como nas

que apresentam vaginite (84%), seguida de *C. glabrata* (MENDES-GIANNINI & MELHEM, 1996; COLLIN et al., 1999).

### 2.2.1.3 *Candida* não *albicans*

As outras espécies de *Candida* têm-se associado a infecções invasoras, umas com provável origem endógena, como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* ou *Candida dubliniensis*, outras com origem principalmente exógena, como *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* ou *Candida guilliermondi* (QUINDÓS, 2002). Entretanto estas espécies têm emergido destacando-se *C.parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. lusitanea* em percentuais que variam geograficamente (ALVES et al., 2000).

Pacientes em imunossupressão profunda têm risco aumentado de desenvolver infecções, sendo este um dos principais fatores responsáveis pela emergência de *Candida spp* não-*albicans*. Secundariamente, o uso aumentado de agentes antifúngicos pode selecionar para espécies não-*albicans* diminuição de suscetibilidade para estes agentes. Por exemplo, o uso profilático do fluconazol tem sido associado à emergência de *C. krusei* e *C. glabrata* (BANERJEE, GANESAN & DATTA, 1991; BARCHIESI et al., 1994), e uso profilático ou empírico da anfotericina B tem sido associada com a emergência de *C.lusitanea* e *C. glabrata* (AHEARN & MCGLOHN, 1984).

Tabela 1 - Características das espécies de *Candida spp* não *albicans*

<b><i>Candida spp</i></b>	<b>Origem</b>	<b>Fatores Predisponentes</b>	<b>Características específicas</b>
<i>C. tropicalis</i>	Endógena (Trato GI)	Neutropenia Dano da mucosa	Exibe distribuição bimodal nos CIMS a azóis
<i>C. glabrata</i>	Endógena	Tumores sólidos Cirurgia abdominal Uso prévio de anfotericina B	Associado com envolvimento de órgãos vitais (coração, fígado, ossos, baço)
<i>C. krusei</i>	Endógena	Neutropenia Uso prévio de fluconazol	Resistência inata para fluconazol <i>in vitro</i>
<i>C. lusitaniae</i>	Endógena Exógena	Neutropenia Doença hematológica	Habilidade para desenvolver resistência para anfotericina B durante terapia
<i>C. dubliniensis</i>	Endógena	Candidíase oral em pacientes imunocomprometidos	- Clamidoconídios no ágar niger - Quando imunidade conferida pelas células T estiver reduzida, aumenta crescimento de <i>C.</i> <i>dubliniensis</i>

Fonte: (COLLIN et al., 1999)

#### 2.2.1.3.1 *Candida dubliniensis*

Em 1995, Sullivan et al., na Irlanda estudando um grupo de leveduras do gênero *Candida* com características atípicas, descreveram uma nova espécie, nomeada *Candida dubliniensis*.

*Candida dubliniensis* é uma descrição recente de espécie de *Candida* relacionada de perto com *Candida albicans* (QUINDOS et al., 1999) e a grande maioria das cepas de *C. dubliniensis* têm sido isolada de lesões da cavidade oral de pacientes com SIDA, especialmente aqueles evidenciando episódios recorrentes da forma eritematosa ou atrófica de

candidíase oral (KIRKPATRICK et al., 1998; PINJON et al., 1998). Também tem sido detectada como causa de candidíases oral em indivíduos HIV positivos, em imunocomprometidos não infectados pelo HIV e, mesmo, em indivíduos saudáveis (SULLIVAN et al., 1999). Estes dados sugerem que a cavidade oral pode se constituir num nicho ecológico natural para *C. dublinensis*. As infecções em indivíduos sadios e imunocompetentes são raras, o que sugere que o sistema imune, em parceria com a microbiota normal, previna o supercrescimento de *C. dublinensis* (KIRKPATRICK et al., 1998). Assim, quando a imunidade conferida pelas células T estiver reduzida, a habilidade de se manter *C. dublinensis* em níveis baixos fica diminuída, permitindo seu crescimento (KIRKPATRICK et al., 1998; SULLIVAN & COLEMAN, 1998).

Além da boca, a *C. dublinensis* tem sido isolada da vagina e fezes (SULLIVAN et al., 1999). Há um relato de candidemia em paciente recebendo quimioterapia antineoplásica para rhabdomiossarcoma e em dois outros, após transplante de medula óssea (MEIS et al., 1999). Além destes casos, não há outras descrições de *C. dublinensis* causando infecções sistêmicas, o que merece continua atenção.

Considerando que a *C. dublinensis* é uma espécie recém-caracterizada e cuja identificação requer procedimentos nem sempre disponíveis em laboratórios clínicos, os dados epidemiológicos disponíveis são ainda muito escassos. A *C. dublinensis* já foi isolada em países como Argentina, Austrália, Bélgica, Canadá, França, Finlândia, Alemanha, Grécia, Irlanda, Espanha, Suíça, Reino Unido e Estados Unidos (SULLIVAN et al., 1997). No Brasil, Milan et al. (1999), em São Paulo, relataram o primeiro caso e Alves et al. (1999), no Rio Grande do Sul, referiram o isolamento de três casos de candidíase causados por *C. dublinensis*.

Na população irlandesa, a *C.dublinensis* foi isolada da boca de 27% de indivíduos HIV positivos e de 32% de pacientes com SIDA e candidíase oral. Da cavidade oral de indivíduos sadios foi isolada 3%, mas com quadro de candidíase oral, chegou a 14,6% (SULLIVAN et al., 1995 e 1997; SULLIVAN & COLEMAN, 1998). Segundo estes autores, os isolamentos de *C.dublinensis* como a única espécie causando candidíase foi de 24,5% dos casos, observando-se nos demais, isolamento concomitante com *C.albicans* (SULLIVAN et al, 1995 e 1999; SULLIVAN & COLEMAN, 1998).

Nos Estados Unidos, Kirkpatrick et al. (1998), estudando prospectivamente 63 pacientes com SIDA, observaram 32% de prevalência de *C.dublinensis*, mas, considerando os 5.500 isolados obtidos, a *C.dublinensis* representou menos de 1%. Por outro lado, Jabra-Rizk et al. (1999) em 724 isolados produtores de tubo germinativo, apenas 7 (0,96%) foram identificadas como *C. dublinensis*. Na experiência de Alves et al. (1999), entre 250 cultivos obtidos de pacientes com SIDA, obtiveram o isolamento de 3 *C. dublinensis*, representando 1,2% das espécies isoladas. Desta forma, as discrepâncias entre os dados epidemiológicos de diferentes autores podem ser explicadas pela metodologia empregada para o primo-isolamento, pois a concomitância com outras espécies de *Candida* é freqüente e características diferenciais não são observadas nos meios de cultura rotineiramente empregados para isolamento.

Odds et al. (1998), revisaram 2.589 cepas de uma coleção originalmente identificada como *C. albicans*, objetivando avaliar a freqüência histórica de *C.dublinensis*. Cinquenta e três amostras foram reidentificadas como *C.dublinensis*, sendo a mais antiga isolada em 1957 e, identificada como *Candida stellatoidea*. Também referem que quatro amostras de *C.dublinensis* desta coleção haviam sido isoladas de episódios de candidíase de pacientes com doenças hematológicas.



Sullivan et al. (1999), revisando coleções de leveduras do Central Bureau voor Schimmelcultures (CBS) da Holanda, reidentificou uma cepa de *C.dublinensis* isolada em 1952 e identificada como *Candida stellatoidea*. Pinjón et al. (1998), avaliando 110 amostras de uma coleção de leveduras isoladas da cavidade oral de indivíduos sadios, observaram que 1,8% eram *C. dublinensis* e que entre 79 isolados da boca de pacientes com SIDA, 16,5% era de *C.dublinensis*.

### **2.3 *Cryptococcus neoformans***

A família *Cryptococcaceae* está inserida na classe dos blastomicetos e na divisão *Fungi Imperfecta*. Nesta família se inclui o gênero *Cryptococcus* com 19 espécies que se caracterizam como células fúngicas leveduriformes com presença de cápsula. Embora tenham sido relatados casos de virulência em outras espécies, é a espécie *C. neoformans* que se destaca pela maior morbidade e frequência nas infecções em humanos e animais (WARREN & HAZEN, 1999).

A espécie *C. neoformans* compreende duas variedades nomeadas *C. neoformans* variedade *neoformans* e *C. neoformans* variedade *gattiii*. Através da utilização de anticorpos policlonais, os sorotipos de *C. neoformans* foram definidos como A, B, C, D e AD. Raros isolados têm ausência de cápsula ou possuem uma cápsula que não pode ser sorotipada. A variedade *neoformans* se relaciona com os sorotipos A, D e AD, enquanto que a variedade *gattii* se relaciona com os sorotipos B e C (MITCHELL & PERFECT, 1995). Entretanto, estudos recentes propõem uma nova classificação incluindo a variedade *grubii*, a qual estaria relacionada somente com o sorotipo A, enquanto que a variedade

*neoformans* compreenderia os sorotipos D e AD (FRANZOT et al., 1999). O cruzamento das formas anamorfas dos sorotipos A e D dá origem a uma forma perfeita, denominada *Filobasidiella neoformans* variedade *neoformans*. Já o cruzamento dos sorotipos B e C dá origem à forma perfeita conhecida como *Filobasidiella neoformans* variedade *bacillispora* (BOTONE et al., 1987; CHERNIAK et al., 1993; WARREN & HAZEN, 1999).

Além dos sorotipos, as variedades do *C. neoformans* também diferem por outras características morfológicas, bioquímicas e epidemiológicas. A variedade *neoformans*, *in vivo*, apresenta morfologia perfeitamente redonda, enquanto que a variedade *gattii* apresenta uma tendência de ser alongada conferindo-lhe um aspecto oval (SIDRIM & MOREIRA, 1998).

Bioquimicamente, a variedade *gattii* é capaz de utilizar os ácidos málicos, fumárico e succínico como única fonte de carbono, situação esta não observada na variedade *neoformans*. Além do mais, a variedade *neoformans* não se desenvolve em meios que contenham glicina. Estas características permitem diferenciar fenotipicamente as duas variedades através de meios de cultivo específicos, como o ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) e creatinina-dextrose-azul de bromotimol-timina. Os isolados da variedade *gattii* ao crescerem nestes meios, promovem uma alteração na cor do meio devido à degradação da glicina ou timina, enquanto que os isolados da variedade *neoformans* não alteram a cor do meio (KWON-CHUNG & BENNET, 1992; SIDRIM & MOREIRA, 1998).

Quanto à epidemiologia, *C. neoformans* variedade *neoformans* está intimamente relacionada a fezes de pombos e apresenta distribuição mundial. *C. neoformans* variedade *gattii* apresenta uma distribuição geográfica restrita a áreas de clima tropical e subtropical e seu habitat

natural está relacionado a espécies de eucaliptos australianos, como *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus tereticornis*.

*C. neoformans* representa o estado anamórfico ou assexuado do basidiomiceto *Filobasidiella neoformans*. Dos isolados clínicos ou da natureza, que são férteis, mais do que 95% pertencem a somente um dos *mating types* ( $\alpha$ ) de *Filobasidiella neoformans*. Na maioria dos casos, somente o estado haplóide ou anamórfico é isolado de infecções clínicas (MITCHELL & PERFECT, 1995).

A patogênese do *C. neoformans* é multifatorial e envolve a ação de muitos fatores de virulência, como presença de cápsula polissacarídica, produção de fenol-oxidase e capacidade de crescer a 37°C (CHERNIAK & SUNDSTROM, 1994).

O polissacarídeo da cápsula do *C. neoformans* tem várias propriedades biológicas que contribuem para a virulência, sendo de maior importância à inibição da fagocitose. A cápsula desta levedura é constituída principalmente por compostos de açúcares como xilose, galactose e ácido úrico. O principal componente capsular é uma glucuroxilomanama (GXM) (CHERNIAK & SUNDSTROM, 1994). Cepas de *C. neoformans* mutantes sem cápsula são menos virulentos em infecções experimentais com camundongos, quando comparados com isolados os quais apresentam cápsula polissacarídica (KOZEL, 1995).

Outro importante fator de virulência é a produção da enzima fenol oxidase, a qual sintetiza melanina e outros pigmentos a partir de compostos di ou polifenólicos. Tem sido demonstrado que a melanina apresenta atividade antioxidante, protegendo, assim, a célula fúngica da ação oxidativa de macrófagos (JACOBSON & TINNELL, 1993). O sistema nervoso é rico em catecolaminas, representa um importante substrato para a fenoloxidase. Alguns estudos têm demonstrado que a melanina

pode proteger o *C. neoformans* da luz UV e reduzir sua suscetibilidade a anfotericina B (WANG & CASADEVAL, 1994a; WANG & CASADEVAL, 1994b).

Recentemente fatores como *mating type*  $\alpha$ , produção de manitol, atividade de proteinases e fosfolipases têm sido avaliados e relacionados com a virulência de *C. neoformans* (NIEHAUS & FLYNN, 1994; KOZEL, 1995; CHEN et al., 1997).

### **2.3.1 Ecologia de *C. neoformans***

*C. neoformans* variedade *neoformans* apresenta distribuição mundial e é freqüentemente isolado de solos e fezes de pombos (CASADEVAL & PERFECT, 1998). A associação entre *C. neoformans* variedade *neoformans* e fezes de pombos têm sido confirmada por diversos estudos (IMWIDHAYA et al., 1989; GRISEO & GALLO, 1997). Métodos de tipagem molecular permitem identificar fezes de pombos como possível fonte de infecção para criptococose. Há relatos na literatura da identificação de mesmas linhagens em excretas de pombos e isolados clínicos (GARCIA-HERMOSO et al., 1997; YAMAMOTO et al., 1996).

O fato de *C. neoformans* ser altamente prevalente em excretas de pombos é provavelmente o resultado de uma notável adaptação bioquímica que permite sua sobrevivência e crescimento neste nicho ecológico. A associação entre *C. neoformans* e excretas de pombos pode ser devida à habilidade única desta levedura em assimilar creatinina como fonte de nitrogênio (CASADEVAL & PERFECT, 1998).

### 2.3.2 Criptococose

Criptococose é doença causada pela levedura capsulada *Cryptococcus neoformans*; outras espécies de *Cryptococcus* podem estar envolvidas, embora em menor escala. A infecção primária no homem é quase sempre via pulmonar após inalação de propágulos da levedura; em animais pode ocorrer após ingestão ou implantação traumática. A infecção pulmonar no homem é quase sempre subclínica e transitória; no entanto, podem resultar em disseminação via hematogênica e ocorrer infecção no sistema nervoso central, na vigência de doença debilitante ou outros fatores. A criptococose pode se apresentar como infecção pulmonar, sistêmica ou meningeal (aguda [raras], subaguda ou crônica) (SIDRIM & MOREIRA, 1998).

A criptococose é causada por duas variedades de *Cryptococcus neoformans*: *C. neoformans*, variedade *neoformans* e *C. neoformans*, variedade *gattii*. Cada uma destas variedades tem dois sorotipos: na variedade *neoformans*, sorotipos A e D; e na variedade *gattii*, B e C. *C. albidus* e *C. laurentii* e, mais recentemente, *C. unigutulatus* têm sido isolados de casos humanos.

*C. neoformans* é basidiomiceto pertencente ao gênero *Filobasidiella* com 2 variedades: *Filobasidiella neoformans*, variedade *neoformans* (sorotipos A e D), e *F. neoformans*, variedade *bacillispora* (sorotipos B e C), dentro da família *Filobasidiaceae* (RICHARDSON & WARNOCK, 1993).

A criptococose, até as décadas de 50-60, ocorria esporadicamente em seres humanos e animais. Com o advento de terapias imunossupressoras agressivas, aumentaram progressivamente os casos confirmados desta doença. Na década de 80, com o advento da SIDA o

número de casos descritos passou a ser bastante alto, sendo que hoje esta doença tornou-se um fator predisponente da criptococose. Criptococose ocorre em 7 a 8% dos pacientes com SIDA nos EUA (MITCHELL & PERFECT, 1995). Europa e América do Sul e em 35% dos pacientes da África. Esta maior prevalência reflete a maior exposição ao fungo neste continente.

No Brasil ocorre em cerca de 6% dos pacientes com SIDA e nos EUA é a quarta infecção oportunista associada (CHERNIAK & SUNDSTROM, 1994). Nos países americanos e europeus, a criptococose associada a pacientes com SIDA é mais comum em homens que mulheres; esta relação na África é de 2:1, permanecendo a mesma antes e depois da SIDA, isto porque, nesta região, a síndrome da imunodeficiência adquirida ocorre em ambos os sexos. Com relação à ocupação e raça não há diferenças na incidência da doença.

Estudos epidemiológicos realizados antes do advento da SIDA mostram que a variedade *neoformans* era amplamente distribuída, enquanto a variedade *gattii* restringia-se a regiões tropicais e subtropicais. Com o surgimento da doença, a porcentagem de casos com esta última variedade diminuiu bastante, e a grande maioria de pacientes com SIDA apresenta a infecção com *C. neoformans*, variedade *neoformans*, independente da localização geográfica (SIDRIM & MOREIRA, 1998).

*C. neoformans*, variedade *neoformans*, é isolado freqüentemente de fezes de pombos ou outras aves, mais raramente do solo contaminado com estes dejetos. Partículas viáveis desta variedade foram isoladas de excretas de pombo e solo. Este propágulo tem sido apontado como capaz de ser inalado e depositar-se nos espaços alveolares, devido ao seu tamanho com menos de 2µm de tamanho.

O isolamento de *C. neoformans* do ar e evidências clínicas de muitos casos de criptococose autopsiados comprovam que a infecção inicia-se pela inalação do fungo (SIDRIM & MOREIRA, 1998).

O fungo com frequência é encontrado em fezes de pombo envelhecidas e acumuladas em torres, cúpulas, telhados e janelas de velhas construções. Células de *C. neoformans* são altamente resistentes a dessecação. Podem ser encontradas cerca de  $5 \times 10^7$  por grama de material fecal. Fezes úmidas ou frescas raramente contêm *Cryptococcus neoformans*, variedade *neoformans*, porque nestas condições a decomposição bacteriana alcaliniza o meio e a levedura não cresce em pH alcalino (RICHARDSON & WARNOCK, 1993; SIDRIM & MOREIRA, 1998).

*C. neoformans* variedade *gattii* cresce em regiões de clima tropical e subtropical e seu habitat natural está relacionado a espécies de eucaliptos australianos (*Eucalyptus sp*) (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). Ellis & Pfeiffer (1990), Identificaram esta variedade em restos de vegetais (madeira, galhos folhas e flores), coletados sob a copa de eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis*), no sudoeste da Austrália, Brasil, México, Uruguai, Califórnia e Colômbia (CASADEVAL & PERFECT, 1998).

Nos últimos anos tem-se questionado se os blastoconídios são as formas infectantes da variedade *neoformans*. Vários pesquisadores têm aventado a hipótese de os basidiosporos serem as formas de infecção. A presença de *C. neoformans* em pombos pode dever-se à ingestão de alimentos contaminados com o fungo. Em animais, descreveu-se criptococose em gado bovino, eqüino, cães, felinos e porcos (SIDRIM & MOREIRA, 1998).

### 2.3.2.1 Manifestações clínicas da criptococose

As manifestações clínicas da criptococose tendem a sobrepor-se em pacientes severamente imunodeprimidos, seja com SIDA ou com outras condições. Os principais sítios de infecção incluem cérebro, pulmões, pele, olhos e próstata. Entretanto, adrenais, ossos, coração, fígado, linfonodos, articulações e rins também podem ser infectados por esta levedura (CASADEVAl & PERFECT, 1998).

#### 2.3.2.1.1 Criptococose pulmonar

Os pulmões representam a porta de entrada da infecção causada por *C. neoformans*. Esta forma clínica em pacientes imunocompetentes pode ser assintomática ou apresentar sinais subclínicos (MITCHELL & PERFECT, 1995). Somente em indivíduos com quadro de imunossupressão é que esta sintomatologia se faz presente. Dessa forma, sinais e sintomas traduzidos de um estado gripal, com tosse e expectoração mucóide em diversos grupos podem ser observados. Outras vezes são referidos sinais mais importantes, como dor torácica, hemoptise e febre (SIDRIM & MOREIRA, 1998).

Em pacientes imunodeprimidos, a infecção criptocócica dos pulmões tende a se disseminar para o sistema nervoso central (RICHARDSON & WARNOCK, 1993).



### 2.3.2.1.2 Neurocriptococose

A razão pela predileção do *C. neoformans* pelo sistema nervoso central não é bem conhecida; todavia, a levedura encontra menor resposta celular (fagócitos) neste local, além da presença de fatores nutricionais, como creatinina e nitrogênio (KWON CHUNG & BENNETT, 1992).

A infecção, acometendo o cérebro e meninges, constitui a forma clínica mais comum de criptococose e a principal causa de morte desta doença. Os sintomas mais freqüentemente observados são cefaléia, náuseas, vertigens e febre moderada. Distúrbios visuais e mentais, como sonolência e confusão mental também ocorrem (RICHARDSON & WARNOCK, 1993).

Aproximadamente 90% dos pacientes apresentam alterações no líquor cefalorraquidiano. Os achados laboratoriais incluem hiperproteinorraquia, hipoglicorraquia e linfocitose. Em muitos casos se observa aumento da pressão intracraniana e hidrocefalia (RICHARDSON & WARNOCK, 1993).

Fernández et al. (1999), realizaram um estudo retrospectivo com pacientes infectados pelo vírus HIV e apresentando meningite por *Cryptococcus*. Os autores observaram que 84% dos pacientes possuíam contagem de células CD4 inferiores a 200 células/ $\mu$ l. Pacientes apresentaram sintomas típicos de cefaléia (80%), febre e sonolência (68%) e distúrbios neurológicos (20%).

### 2.3.2.1.3 Outras formas clínicas da criptococose

A criptococose cutânea é observada em aproximadamente 10% dos casos de criptococose. O couro cabeludo, a face, pescoço, e membros são freqüentemente envolvidos. As lesões são variáveis e consistem de pápulas, nódulos subcutâneos, abscessos e ulcerações únicas ou múltiplas, com 3-6 mm de diâmetro, rosadas, regulares, hemisféricas e com uma leve depressão central (RICO & PENNEYS, 1985).

A glândula prostática tem sido reconhecida como um sítio de localização do *C. neoformans*. Normalmente, não há sintomas de prostatite, todavia, esta levedura tem sido isolada do tecido prostático e sangue após procedimento urológico, representando um importante reservatório para o fungo, podendo ser responsável por recidivas em casos de meningite (MITCHELL & PERFECT, 1995).

Casos de osteomielite são mais comuns em pacientes com criptococose disseminada, acometendo 5 a 10% destes pacientes. A coluna vertebral, crânio, ossos longos, e costelas podem ser afetados. As lesões ósseas são similares às aquelas observadas em blastomicose e coccidioidomicose, são múltiplas, destrutivas e crônicas. Edema e dor podem estar presentes (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

Manifestações oculares de criptococose também podem ocorrer, e incluem papiloedema e coriorretinites. Papiloedema ocorre em pacientes com meningoencefalite como resultado do aumento da pressão intracraniana; já a coriorretinite freqüentemente precede outras manifestações de criptococose disseminada (RICHARDSON & WARNOCK, 1993).

### 2.3.2.2 Diagnóstico laboratorial da criptococose

O diagnóstico laboratorial da criptococose é baseado em três fundamentos: a demonstração do fungo no material clínico, o isolamento em cultura e a identificação, e por último, a pesquisa de antígenos circulantes (SIDRIM & MOREIRA, 1998).

Para análise microscópica, o procedimento mais utilizado constitui-se em homogeneizar uma gota do material biológico (líquor, escarro, lavado-brônquico, biópsia, etc.) a ser analisado com uma gota de tinta da China diluída a 50%. Na microscopia serão observadas estruturas blastoconidiadas, com 5-10  $\mu\text{m}$  de diâmetro, redondas ou ovaladas, podendo apresentar brotamentos. A tinta da China revela a cápsula polissacarídica, permitindo a diferenciação de outras leveduras (MENDES-GIANNINI & MELHEM, 1996).

Para o cultivo, o material biológico deve ser semeado em ágar Sabouraud, isento de ciclohexemide ou ágar Sabouraud, acrescido de antibacterianos para inibição bacteriana. As culturas se desenvolvem em 24-48 h a 30°C; se houver pouco material aguardar até 7 dias. As colônias são brancas e cremosas, como leite condensado. As técnicas de identificação são realizadas com base em testes como o crescimento à 37°C, a patogenicidade para camundongos, a produção de pigmento no ágar *Guizotia abyssinica*, *Vicia faba*, niger ou ácido cafeico. No auxanograma com fontes de Carbono, assimilam inositol e lactose; são urease positivos e sensíveis a ciclohexemide (WARREN & HAZEN, 1999).

O diagnóstico imunológico utiliza principalmente o teste de aglutinação com partículas de látex, revestidas com globulina anti *C. neoformans* para pesquisa do antígeno polissacarídeo deste fungo. O antígeno pode ser detectado em vários líquidos biológicos como soro,

líquor, urina e aspirado ou lavado broncoalveolar. Vários *kits* comerciais estão disponíveis, incluindo partículas revestidas com anticorpos poli ou monoclonais. Entretanto, reações falso-positivas podem ocorrer, relacionadas com fator reumatóide, *Trichosporon beigelli* e bacilos gram negativos (MENDES-GIANNINI & MELHEM, 1996).

Histologicamente, leveduras encapsuladas podem ser vistas em uma variedade de colorações. A coloração de prata revela esferas escuras no tecido, enquanto que, a coloração de mucicarmim dá a cápsula uma cor rosa, a qual é patognomônica de infecção (ENRENSING & SAAG, 2001).

## **2.4 EVOLUÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS AGENTES ANTIFÚNGICOS**

As drogas antifúngicas são estudadas em grupos: os poliênicos (nistatina e anfotericina B), derivados azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, econazol e etc) e alilaminas (naftifina, terbinafina), ou isoladas representadas pela fluocitosina e griseofulvina (SIDRIM & MOREIRA, 1998).

A crescente incidência de infecções fúngicas tem causado o estabelecimento e avaliação de novas drogas antifúngicas dentre estas os derivados triazólicos (voriconazol, posaconazol, ravuconazol e albaconazol) e as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) (NEUFELD, 2003).

De acordo com a classificação clínica das micoses, relacionadas com o local onde se encontra o agente patogênico, considera-se a

conduta terapêutica. Assim as drogas mais utilizadas no tratamento das micoses subcutâneas e sistêmicas são a anfotericina B, fluocitosina e alguns derivados azólicos, em especial o cetoconazol, fluconazol e itraconazol. Por outro lado a griseofulvina, a nistatina, o clotrimazol, o miconazol, o econazol, a naftifina e terbinafina e amorolfina, são mais indicados nas infecções superficiais (SIDRIM & MOREIRA, 1998).

Contrastando com o elevado número de antibacterianos comercialmente disponíveis, a terapêutica antifúngica sistêmica é bastante limitada. O antifúngico ideal deve ser de amplo espectro, atóxico, com atividade oral e parenteral, sem resistências, com farmacocinética adequada e baixo custo (NEUFELD, 2003; BODEY, 1993).

O miconazol foi o primeiro antifúngico a ser utilizado, de modo sistêmico, na terapêutica empírica das micoses em pacientes neutropênicos, com significativo sucesso. Entretanto, pelo fato da administração endovenosa desse antifúngico estar associada à anemia microcítica e a arritmias cardíacas, sua utilização tem sido limitada a situações clínicas muito particulares, embora as formulações para uso tópico continuem sendo largamente empregadas (BODEY, 1993; JORDAN et al., 1979; RICHARDSON & WARNOCK, 1993; WINGARD et al., 1987).

O cetoconazol foi o primeiro azólico disponível para administração por via oral, sendo bastante eficaz no tratamento das candidíases de orofaringe e esofágica, e considerado superior a agentes não absorvidos, como a nistatina. Comparações entre terapêuticas com cetoconazol e anfotericina B em pacientes com câncer, mostraram que ambas as drogas eram igualmente eficazes no tratamento da candidíase esofágica, mas ineficazes nas candidíases profundas, sobretudo nos pacientes com câncer ou com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). Os níveis séricos encontrados para o cetoconazol, sugerindo absorção parcial,

assim como a ausência de formulação parenteral, são fatores que limitam sua utilização (BODEY, 1992; BODEY, 1993; FAINSTEIN et al., 1987; RICHARDSON & WARNOCK, 1993; WALSH & LEE, 1993).

O fluconazol é um triazólico com diversas vantagens sobre os demais antifúngicos, porque se encontra disponível em formulações para uso oral e parenteral, tem excelente biodisponibilidade, meia-vida longa, baixa toxicidade, não interage com citocromo-P-450 hepática, nem apresenta efeitos inibidores sobre a quimiotaxia dos leucócitos, como fazem o cetoconazol e o itraconazol. Estes atributos, associados às dificuldades diagnósticas das candidíases, levaram a uma ampla indicação do fluconazol, tanto para a profilaxia como para a cura das infecções por *Candida* ou outros fungos em pacientes com diferentes doenças de base. No entanto, este antifúngico apresenta restrições de uso em pacientes com insuficiência renal e, sobretudo, nas infecções causadas por *C. krusei*, *C. glabrata* e *Aspergillus* spp (BODEY, 1992; KOWALSKI & DIXON, 1991; RICHARDSON & WARNOCK, 1993; WINGARD, 1995).

O itraconazol é outro triazólico que vem sendo amplamente indicado, com a vantagem de ser ativo contra espécies *Aspergillus*, *C.krusei* e *C.glabrata* e pode ser utilizado em pacientes com insuficiência renal. Exerce ação específica sobre a citocromo P-450 dos fungos, causando alteração e rompimento da membrana citoplasmática destes microorganismos, sem afetar o sistema enzimático do homem nas doses terapêuticas (TAVARES, 1996). Apresenta as limitações de uso exclusivamente na forma oral e sua biodisponibilidade é variável, especialmente nos pacientes com câncer ou SIDA. Comparando-se com o fluconazol, é consideravelmente menos conhecido quanto a sua eficácia em casos de candidíase em pacientes granulocitopênicos (BODEY, 1992 e 1993; NEGRONI & ARECHAVELA, 1993; RICHARDSON & WARNOCK, 1993; WALSH & LEE, 1993; WINGARD, 1995).

Entre os poliênicos, destaca-se a anfotericina B, devido a sua grande importância clínica. Apesar de muitas décadas de uso, esse poliênico permanece como um dos importantes recursos terapêuticos, sobretudo pela ação letal contra diversos fungos causadores de micoses profundas em pacientes imunocomprometidos (BODEY, 1992; RICHARDSON & WARNOCK, 1993; WALSH & LEE, 1993). Embora a anfotericina B tenha se tornado o principal apoio de terapia rápida para infecções sérias, seu uso foi associado com efeitos colaterais da infusão e nefrotoxicidade dose-limitando-a (MAERTENS, 2004). Como alternativa a esta situação surgiram algumas formulações lipídicas de anfotericina B, muito utilizadas durante os anos 90, principalmente em pacientes de alto risco. O alto custo destas formulações torna difícil sua utilização de maneira rotineira (COLOMBO, 2003).

A contínua pesquisa para antifúngicos novos e menos tóxicos conduziu a descoberta de diversos azóis décadas mais tarde (MAERTENS, 2004). Além destes, novas formulações estão sendo preparadas para melhorar a absorção e eficácia de algumas destas terapias padrão. Vários novos antifúngicos têm demonstrado potencial terapêutico. Três novas drogas têm sido desenvolvidas, e podem ser usadas em infecções fúngicas sistêmicas e superficiais: voriconazol, ravuconazol e posaconazol são triazóis com amplo espectro de atividade (GUPTA & TOMAS, 2003).

Caspofungina e micafungina pertencem a uma nova classe de antifúngicos da família equinocandinas. Com um mecanismo de ação diferente eles afetam a parede da célula fúngica (GRANIER, 2002).

Outra droga desenvolvida para melhorar o tratamento das infecções fúngicas é o albaconazol (UR-9825). É um novo triazol com um potente e amplo espectro de atividade antifúngica e excelente biodisponibilidade (CAPILLA et al., 2001; RAMOS et al., 1999).

## 2.4.1 Os azóis

### 2.4.1.1 Aspectos históricos

A descoberta da atividade antifúngica dos compostos azólicos representou um importante avanço no tratamento das micoses. Em 1969, o clotrimazol foi lançado para uso tópico, seguido do miconazol, disponível para uso tópico e sistêmico. No entanto, a toxicidade deste último determinou novas buscas que resultaram no lançamento do cetoconazol que, por ser facilmente absorvido a partir do trato gastrointestinal, permite administração oral. Ainda que os efeitos colaterais dos azóis de atividade sistêmica sejam menores do que os evidenciados para a anfotericina B, a eficácia dos mesmos tem se mostrado inferior a do poliênico, sobretudo nas micoses oportunistas em pacientes imunocomprometidos (BODEY, 1992; DROUHET & DUPONT, 1987; RICHARDSON & WARNOCK, 1993).

A introdução da primeira geração dos triazóis representou o segundo maior avanço no tratamento de infecções fúngicas, após o desenvolvimento dos antifúngicos poliênicos (MAERTENS, 2004).

O progresso na terapêutica antimicótica ocorreu com a síntese dos triazóis, que se diferenciam dos imidazólicos por possuírem um terceiro átomo de N no grupamento azol. Essa configuração estrutural conferiu aos agentes uma afinidade mais seletiva, em termos moleculares, com o sítio de ação (NEGRONI & ARECHAVELA, 1993; RICHARDSON & WARNOCK, 1993; SUGAR *et al*, 1992). Representantes dos triazóis são o fluconazol, o itraconazol, o albaconazol e ravuconazol. Fluconazol e itraconazol exibem maior atividade antifúngica do que imidazóis e tem marcadamente melhor perfil de segurança comparado com a anfotericina B e cetoconazol (MAERTENS, 2004). Dentre eles o itraconazol possui espectro de ação mais amplo, porque inclui algumas espécies de



*Aspergillus* e todo gênero *Candida*. O fluconazol é inativo para *Aspergillus* e induz a resistência de *C. krusei* e *C. glabrata* (NEGRONI & ARECHAVELA, 1993; RICHARDSON & WARNOCK, 1993; SUGAR et al., 1992).

Maertens (2004) relata que o uso muito difundido destes agentes torna-se sujeito a limitações clínicas importantes, relacionadas a espectro de atividade sub-ótima, desenvolvimento de resistência, indução de arriscadas interações droga-droga. Para vencer estas limitações, diversos análogos têm sido desenvolvidos.

Segundo Granier (2002), Gupta (2003) e Maertens (2004), a recente emergência de novas moléculas e classes de antifúngicos levantam a esperança de novas perspectivas terapêuticas, como a segunda geração dos triazóis, incluindo voriconazol, posaconazol e ravuconazol os quais tem maior espectro e potência que os de primeira geração e possuem atividade aumentada contra patógenos resistentes e emergentes, em particular contra *Aspergillus* sp e *Candida* sp, resistentes ao fluconazol. O perfil de toxicidade destes agentes é comparável ou melhor do que aqueles de primeira geração dos triazóis e a interação das drogas continua manejável.

As diferenças no metabolismo, farmacocinética, reações adversas e interações medicamentosas, norteiam a escolha de um ou de outro (NEGRONI & ARECHAVELA, 1993; RICHARDSON & WARNOCK, 1993; SUGAR et al., 1992).

#### 2.4.1.2 Mecanismos de ação dos antifúngicos azólicos

Esses compostos exercem sua ação antifúngica por meio de diversos mecanismos. O mais importante é o da inibição da biossíntese do ergosterol, principal esterol constituinte da membrana plasmática dos fungos (SHEENAN et al, 1999; HICHTCOCK, 1991).

Na célula fúngica íntegra, a biossíntese do ergosterol envolve a participação da enzima 14- $\alpha$ -desmetilase (14 DM), que é dependente da citocromo-P-450. Esta designa um conjunto de proteínas, localizada no retículo endoplasmático liso ou membrana mitocondrial, as quais contém um átomo de Fe no grupo heme da protoporfirina IX e exercem importantes funções nas vias metabólicas dos eucariotos (BODEY, 1992).

Em termos moleculares, o mecanismo de ação pode ser assim resumido: os azóis, cuja característica é possuir um anel heterocíclico com um átomo de N disponível (N-3 do anel imidazólico e N-4 do triazólico), estabelecem uma ligação com o Fe do heme, na sexta posição de coordenação (BODEY, 1992; KELLY, ROWE, WATSON, 1991; KERRIDGE et al., 1987; VANDEN BOSSCHE, WILLEMSSENS, MARICHAL, 1987); o N heterocíclico do azol deve ter um par de elétrons estericamente acessível e um radical lipofílico ligado ao N-1 do anel. Não ocorrem substituições nas posições 2,4 e 5 do anel imidazólico ou nas posições 1 e 3 do triazólico, o que sugere que a enzima 14- $\alpha$ -desmetilase tenha um sítio ativo discreto, podendo acomodar ligantes aromáticos planares que simulam o lanosterol. O restante da molécula do antifúngico interage com a apoproteína da citocromo-P-450, onde, a estrutura de cada azol determinará sua especificidade, na dependência desta ligação (HICHTCOCK, 1991; VANDEN BOSSCHE, WILLEMSSENS & MARICHAL, 1987).

A lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase catalisa a remoção do grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) do lanosterol. Os azóis ligam-se à enzima e a inativam, evitando, portanto, a fase da desmetilação. O acúmulo resultante de lanosterol e a depleção de ergosterol rompem a estrutura e a função da membrana celular inibindo, portanto, o crescimento fúngico. Os azóis são drogas basicamente fungistáticas. O bloqueio na síntese do ergosterol leva, como consequência, a formação de membrana plasmática alterada em sua fluidez e permeabilidade, pela ausência de ergosterol e excesso de esteróis metilados (tóxicos), prejudicando o crescimento dos fungos (BODEY, 1992; HITCHCOCK, 1991; VANDEN BOSSCHE, WILLEMSSENS & MARICHAL, 1987).

Outros importantes sítios de ação dos azóis compreendem: as alterações nas enzimas localizadas na membrana fúngica (SURARIT & SHEPERD, 1987), o descontrole na síntese de quitina (VANDEN BOSSCHE, WILLEMSSENS & MARICHAL, 1987), como também alterações nas enzimas citocromo C oxidase, peroxidase e catalase (DE NOLLIN et al., 1977; THOMAS, 1986).

Os efeitos atenuados sobre as células dos mamíferos em relação aos efeitos sobre as células fúngicas contribuem para o perfil de tolerabilidade favorável dos antifúngicos triazólicos (GROLL, 1998).

#### 2.4.1.3 Mecanismos de resistência aos azóis

Segundo Sanglard et al. (1995) e White et al., 1998, os principais mecanismos de resistência aos derivados azólicos incluem:

- Redução da suscetibilidade da enzima 14- $\alpha$ -desmetilase;

- Amplificação do gene 14 DM, codificando a superprodução da enzima 14- $\alpha$ -desmetilase e, conseqüentemente, requerendo maiores doses do azólico para inibição do fungo;
- Redução da atividade da enzima D-5-6-dessaturase;
- Alterações na relação fosfolipídios/esterol não esterificado. O aumento dos esteróis não esterificado reduz a permeabilidade da membrana fúngica, conduzindo a menor captação do antifúngico. Hitchcock et al. (1986) evidenciaram que os azóis em baixas concentrações determinam a saturação dos ácidos graxos, concorrendo para a redução da sensibilidade. Assim, a profilaxia antifúngica nos pacientes imunocomprometidos, pode determinar a ocorrência deste fenômeno;
- Aumento da escaleno-epoxidase que é acompanhada do aumento da 14- $\alpha$ -desmetilase, com conseqüente aumento da biossíntese do ergosterol;
- Modificações estruturais na proteína citocromo P-450 do fungo;
- Efluxo da droga, o que consiste na saída do antifúngico do interior das células fúngicas, através de transporte ativo. Proteínas transportadoras, como as MFS (*major facilitator superfamily*) e a glicoproteína P, são especializadas no bombeamento de algumas drogas do interior celular para o meio externo. Os genes que codificam tais enzimas estão sob investigação e são chamados PDR (*pleiotropic drug resistance*), porque determinam a resistência a várias drogas. Ocorre efluxo em *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida albicans* resistentes ao fluconazol (PARKINSON et al., 1995).

A rápida emergência de leveduras resistentes ao fluconazol motivou a realização de estudos com as mesmas. Assim, verificou-se que a resistência de *C.albicans* a esse triazol poderia estar baseada na alteração da enzima 14- $\alpha$ -demetilase ou na redução da assimilação do antifúngico (VANDEN BOSSCHE, MARICHAL, ODDS, 1994). Em

*C. glabrata* resistentes ao fluconazol, os estudos evidenciaram diferentes causas como a redução na assimilação do antifúngico (HITCHCOCK et al., 1993), a amplificação do gene CYP 51, com superprodução de 14- $\alpha$ -desmetilase ou, ainda, o aumento da enzima esqualeno epoxidase (VANDEN BOSSCHE et al., 1992). Por outro lado, a resistência de *C. krusei* foi esclarecida, a partir da determinação do conteúdo intracelular deste azol em duas cepas, evidenciando-se concentração muito reduzida em uma delas e normal em outra. Segundo o autor, esse achado pode explicar porque a resistência dessa espécie ao fluconazol pode ser um fenômeno primário ou induzido (VANDEN BOSSCHE; WARNOK; DUPONT, 1994).

Além desses mecanismos, há constatações sobre o desenvolvimento de um tipo de resistência transitória. A célula fúngica pode alterar seu fenótipo, provavelmente através de uma expressão gênica transitória, e assim, tornar-se resistente em presença de uma droga. Entretanto, tal fenótipo de resistência poderá ser rapidamente revertido a um fenótipo sensível, caso a droga seja retirada, por algum tempo. Esta resistência transitória é também chamada resistência epigenética e ainda há poucos estudos a seu respeito (WHITE et al., 1998; ALVES et al., 2002).

As falhas da terapêutica antifúngica precisam ser minuciosamente esclarecidas, para que a resistência possa ser corretamente identificada. Nos insucessos terapêuticos, é de importância conhecer alguns pontos (GRAYBILL, 1996):

- O estado imunológico do paciente, porque agentes, como os azólicos, não tem atividades fungicidas e, nestas situações, tal efeito pode ser necessário;
- Se os níveis séricos do antifúngico foram atingidos para se descartar problemas de má absorção;

- Se não estão ocorrendo interações medicamentosas antagônicas com os antifúngicos em uso;
- Se houve a correta identificação do fungo, pois *Candida krusei* e *Candida glabrata*, são naturalmente resistentes ao fluconazol.

Caso nenhum destes fatores esteja ocorrendo, a resistência deverá ser investigada.

#### 2.4.1.4 Espécies de *Candida* resistentes aos azóis

Os derivados imidazólicos foram introduzidos na terapêutica antifúngica em 1969. Nos anos seguintes, as pesquisas objetivadas a induzir resistência "*in vitro*" não tiveram pleno sucesso (SCHOLER & POLAR, 1984).

A primeira descrição de resistência "*in vivo*" a derivados imidazólicos, com confirmação laboratorial, foi realizada por Holt & Azmi em 1978, a partir de uma criança submetida a prolongado uso de miconazol para tratamento de candidose urinária.

O cetoconazol, lançado como o primeiro antifúngico de administração oral, passou a ser utilizado em diversas condições clínicas. Emergiu, então, o primeiro caso de resistência a este azólico, descrito por Rosemblat et al., em 1980. Dos longos tratamentos para candidose mucocutânea crônica, surgiram novos casos de resistência a esse imidazol (HORNBURGH & KIRKPATRICK, 1983; WARNOCK et al., 1983). Relatos considerados pioneiros para determinada classe de pacientes, foram os de Cabré et al. (1985), que observaram resistência ao cetoconazol em heroinômano, e de Tavitian et al. (1986), que verificaram

tal resistência no tratamento de candidose esofágica em paciente portador de SIDA.

Em 1988, WARNOCK et al., relataram o primeiro caso de candidose refratária ao fluconazol, onde o agente causador, *C. glabrata*, tornou-se resistente ao triazólico, após nove dias de tratamento.

A partir de 1990, houve acentuado aumento do número de casos de SIDA. Devido à profunda imunodepressão, infecções por *Candida*, especialmente as formas oral e esofágica, têm sido freqüentes e de difícil tratamento nos portadores desta síndrome. A terapêutica com o fluconazol, considerado menos tóxico e com melhores níveis de tolerância e absorção do que o cetoconazol passou a ser rotineiramente utilizada, requerendo, porém, longos períodos de tratamento (JOHNSON et al., 1995). Desta nova situação emergiu, em dimensões ainda não observadas com outros antifúngicos, o fenômeno da resistência de *Candida* ao fluconazol, com mais de três dezenas de relatos até 1994 (REX, RINALDI e PFALLER, 1995). A marcada resistência ao fluconazol envolve, principalmente, as espécies *C.krusei* e *C.glabrata*. Segundo determinados autores, estas espécies são naturalmente resistentes a este triazólico (ABRAHAMSEN et al., 1992; WINGARD et al., 1991), ou seja, apresentam resistência primária; para outros (KUNOVÁ et al., 1995; ODDS, 1993), porém, é secundária ao uso de fluconazol e, ainda, segundo alguns pesquisadores (WINGARD, 1994 e 1995), é variável, ou seja, há cepas primariamente resistentes e cepas inicialmente sensíveis que se tornam resistentes após exposição a este antifúngico. A resistência ao fluconazol também tem sido verificada, mas em menor proporção, em outras espécies, como *C.albicans* (BOKEN, SWINDELLS, RINALDI, 1993; FAN-HAVARD et al., 1991; ODDS, 1993; SWERDLOFF, FILLER, EDWARDS, 1993; WHITE & GOETZ, 1994) e *C.tropicalis* (BLUMBERG, HENDERSHOT, LOTT, 1992), ocorrendo,

predominantemente, como conseqüência de tratamento com este triazólico.

Em relação ao itraconazol, já foram relatados isolados de *C.glabrata*, oriundos de três casos de vulvovaginites, que não responderam ao tratamento com este azol (WHITE, JOHNSON, WARNOCK, 1993). Comparando a suscetibilidade de cepas dessa espécie, isoladas no período de 1980 a 1991, com cepas isoladas entre 1991 e 1995, Tiballi et al. (1995a), verificaram que frente as primeiras a CIM 90 do itraconazol foi de 0,8 µg/ml, enquanto que para as do último período, foi de 3,2 µg/ml; constataram também, que a CIM 90 observada para as do último período, coincidiu com a mais ampla utilização do fluconazol. Em adição, foram descritos isolados de *C.glabrata* (WINGARD, 1994) e de *C.albicans* (BARCHIESI et al., 1994; LE GUENEC et al., 1995), resistentes não só ao itraconazol, como também ao fluconazol. Segundo alguns autores, essa ocorrência é menos comum com o itraconazol do que a observada com o cetoconazol e o fluconazol, embora sua prevalência ainda seja desconhecida (JOHNSON & WARNOCK, 1995; ODDS, 1993).

#### 2.4.1.4.1 A resistência de *C. dubliniensis* a antifúngicos

Os primeiros estudos de suscetibilidade de *C. dubliniensis* frente aos antifúngicos detectaram 4 cepas resistentes ao fluconazol, numa população de 20 amostras (MORAN et al., 1997). Estes autores também observaram que a resistência ao fluconazol não se estendia aos demais azólicos nem a anfotericina B. Ademais constataram que a exposição seqüencial de *C. dubliniensis* sensível ao fluconazol (CIM = 0,5µg/ml) a



concentrações crescentes deste triazólico, determinava rápido desenvolvimento de resistência (CIM = 64µg/ml) e ainda que tal resistência era estável, mesmo após 10 subcultivos em meios isentos de antifúngicos.

A facilidade de *C. dublinensis* desenvolver resistência ao fluconazol é muito peculiar, pois, estudos similares realizados com *C. albicans* não observaram tal fenômeno após 148 subcultivos em meio contendo azólicos (VANDEN BOSSCHE et al., 1990).

Moran et al. (1997) também observaram que a indução da resistência *in vitro* ao fluconazol foi acompanhada de polimorfismos de DNA, indicando que rearranjos genéticos podem ocorrer sob forte pressão seletiva, talvez útil ao fungo nas condições adversas, determinadas pelo antifúngico. O mecanismo de resistência através do efluxo também tem sido sugerido, contudo, ainda não comprovado.

Os estudos de Odds et al. (1998), em relação à suscetibilidade em cepas de coleções, indicaram, através de comparação das médias geométricas, que a *C. dublinensis* é mais sensível a anfotericina B e 5-fluorocitosina do que *C. albicans*, mas é significativamente menos sensível aos azólicos.

Considerando que a *C. dublinensis* tem sido associada com episódios de candidíase recorrente, em pacientes HIV positivos, há sugestões de que sua recente emergência como patógeno humano possa ser resultado de uma seleção depois de prolongada utilização de antifúngicos. Todavia, vários estudos têm revelado que a grande maioria dos isolados de *C. dublinensis* é sensível aos antifúngicos (MORAN et al., 1997; PFALLER et al., 1999; SULLIVAN et al., 1999). Por outro lado, a comparação das médias geométricas das CIMs de *C. dublinensis* e *C. albicans* frente ao fluconazol, itraconazol e cetoconazol, indicaram que a

*C. dublinensis* requer concentrações inibitórias mais elevadas do que a *C. albicans* (ODSS & BERNAERTS, 1994). Este fato provavelmente representa uma vantagem seletiva da *C. dublinensis*, o que justificaria sua recorrência nas candidoses dos pacientes com SIDA (PFALLER et al., 1999; SULLIVAN et al., 1999). Até o momento, a resistência de *C. dublinensis* aos demais antifúngicos ainda não foi relatada (ALVES et al., 1999; BERROUANE et al., 1999; MORAN et al., 1997; SULLIVAN et al., 1997).

#### **2.4.2 Resistência do *Cryptococcus neoformans* aos agentes antifúngicos**

Falhas em tratamentos de infecções fúngicas têm chamado a atenção dos pesquisadores para o grave problema da resistência aos agentes antifúngicos e os mecanismos envolvidos neste fenômeno (VANDEN BOSSCHE et al., 1993). O número de isolados de *C. neoformans* resistentes aos antifúngicos, especialmente a anfotericina B é crescente, todavia, resistente ao fluconazol, também têm sido observada (BODENHOFF, 1968; POWERLY et al., 1990; ALVES et al., 1997).

##### **2.4.2.1 Resistência aos antifúngicos azólicos**

Vários mecanismos são conhecidos por contribuir com a resistência a antifúngicos azólicos. Cepas resistentes exibem modificações na qualidade ou quantidade de enzimas alvo, reduzindo

assim, o acesso do antifúngico ao seu sítio de ação (GHANNOUM & RICE, 1999). Um mecanismo de resistência muito comum para azólicos é uma modificação na composição dos esteróis de membrana em consequência de danos na citocromo P-450 desmetilase (ESPINEL-INGROFF, 1997). Outras enzimas também estão envolvidas em mecanismos de resistência, como é o caso da delta 5,6 esterol dessaturase, a qual é codificada pelo gen ERG3 (WATSON et al., 1989). Análise de esteróis em *C. neoformans* resistentes ao fluconazol sugerem a presença de alterações nos genes ERG2 ou ERG3 (WHITE et al., 1998).

Outra forma de resistência a azólicos ocorre devido ao incremento no mecanismo de efluxo. A entrada do fluconazol na célula fúngica se dá por difusão facilitada, assim, a concentração intracelular da droga depende do balanço entre o influxo do fármaco e o efluxo celular. Células eucarióticas possuem duas bombas de efluxo, as quais são conhecidas por contribuir com resistência a antifúngicos. Estas bombas regulam o transporte e o acúmulo de fluconazol intracelular; assim alterações nestas bombas, podem determinar resistência a antifúngicos (ESPINEL-INGROFF, 1997; WHITE et al., 1998). VENKATESWARLU et al. (1997), observaram uma redução no conteúdo celular de fluconazol em células de *C. neoformans* com altos níveis de resistência a este antifúngico. Joseph-Horne et al. (1995) analisaram cepas de *C. neoformans* mutantes e identificaram resistência cruzada a anfotericina B e fluconazol, sem alteração nos esteróis de membrana, porém com redução no conteúdo intracelular de fluconazol.

## 2.5 NOVOS AGENTES ANTIFÚNGICOS

### 2.5.1 Albaconazol

Albaconazol é um enantiômetro individual pertencente à classe dos agentes antifúngicos triazólicos. É um inibidor da C-14-desmetilase, enzima fundamental na biossíntese da parede celular (FAUS, 2003). Tem um núcleo quinazolinona. A substituição de um radical halogenado na posição 7 na quinazolinona direita produz o mais potente produto *in vitro*. Neste caminho, a 7-Cl derivativo (1R, 2R) – 7 – cloro – 3 – 2 – (2,4 – difluorofenil) – 2 – hidroxil – 1 – metil – 3-(1H-1,2,4-triazol-1-) propilquinazolin-4(3H)-ona, foi selecionado de vários derivados devido à alta atividade *in vitro* e bom perfil farmacocinético (RAMOS et al., 1999).

No momento atual, as opções de tratamento para infecções oportunistas estão ainda direcionadas a anfotericina B e, para alguns menos graves, poucos derivados dos azóis, os quais freqüentemente falham. Por esta razão o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos potentes e de amplo espectro são importantes desafios para a medicina moderna. O albaconazol (UR-9825) é um novo agente triazólico com atividade antifúngica potente e de amplo espectro, boa farmacocinética e excelente biodisponibilidade. Tem sido demonstrado ter boa atividade *in vitro* contra leveduras patógenas, e alguns fungos filamentosos. Em experimentos em modelos animais, têm também tido atividade para tratamento de aspergilose e candidíase sistêmica (CAPILLA et al., 2001).

Segundo Ramos et al. (1999), alguns estudos *in vitro* com albaconazol têm mostrado que este agente antifúngico é mais potente do que fluconazol, itraconazol e outros agentes azólicos contra *Candida* spp e outras espécies de fungos. *In vivo*, mostrou eficácia em alguns exemplos de candidíase sistêmica em ratos e coelhos. Também dispõe de atividade comparável com a do fluconazol e com baixa toxicidade.

Capilla et al. (2001) comparou a atividade *in vitro* do albaconazol com anfotericina B contra diversas cepas de importantes fungos filamentosos. Os CIMs do albaconazol foram em geral menores do que da anfotericina B em diversas cepas de fungos oportunistas, incluindo algumas espécies refratárias ao tratamento com as *P. lilacinus*.

Outro estudo de Capilla et al. (2003) verificou que a eficácia terapêutica do albaconazol frente ao tratamento de infecção disseminada de *Scedosporium proliferans* em coelhos foi mais efetiva que anfotericina B, e as taxas de sobrevivência foram similares aos obtidos com anfotericina B.

A atividade do albaconazol em comparação com flucitosina, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e voriconazol, mostrou *in vitro* perfil similar contra 70 cepas de *Malassezia* spp. (GARAU, 2003).

Num estudo de Miller et al. (2004), foi comparado à atividade do albaconazol com fluconazol contra 12 isolados de *C. neoformans in vitro* e contra um isolado *in vivo* em um coelho com meningite criptocócica. O albaconazol foi cem vezes mais potente *in vitro* que o fluconazol e foi fungicida em concentrações relevantes. Os coelhos infectados foram tratados com albaconazol e fluconazol e o limite de penetração no espaço subaracnóide e em todas as doses testadas o albaconazol foi tão efetivo quanto fluconazol para o tratamento da meningite criptocócica em coelhos.

Albaconazol mostrou atividade *in vitro* levemente maior do que do voriconazol e superior a do itraconazol e fluconazol. É ativo contra a maioria das cepas resistentes ao fluconazol. A atividade contra fungos filamentosos é comparável a do voriconazol e itraconazol e maior do que o fluconazol. Administrado oralmente em animais, mostra potente atividade em modelos animais com candidíase sistêmica, aspergilose, criptococose e scedosporiose. Albaconazol inibe CYP3A4 somente em

concentrações significativas (maiores do que valores CIM). Perfil de segurança excelente em humanos em doses únicas e repetidas. O perfil de farmacocinética em humanos suporta uma dose ao dia (FAUS, 2003).

### 2.5.2 Ravuconazol

Ravuconazol é um triazol oral derivado do fluconazol que foi descoberto por Eisai Co., Japão (1998), e licenciado por Bristol-Myers-Squibb, como BMS-207147. Tem um amplo espectro antifúngico e potente atividade contra a maioria dos fungos patógenos como *Aspergillus fumigatus*, *C. neoformans*, *Candida spp* e dermatófitos (DIEKEMA et al., 1999; FUNG-TOMC et al., 1998; HATA et al., 1996a).

A droga está sob investigação pré-clínica (SHEEHAN, HITCHCOCK & SIBLEY, 1999). Tem aparentemente farmacocinética linear, biodisponibilidade oral (47-74%) dependendo da espécie animal e meia-vida plasmática de 4-5h em ratos e 8h em cachorros (WALSH et al., 2000). Em outros estudos em modelo animal, demonstrou que ravuconazol tem eficácia comparável com itraconazol e mais efetivo contra criptococose sistêmica, pulmonar e intracraniana (HATA et al., 1996b). Em adição, estudo de farmacocinética com humanos usando 400 mg/dia de regime de dose múltipla oral (14 dias) demonstrou concentração plasmática de 6,02 µg/ml e área sobre a curva de concentração-tempo no plasma de 119,12 µg h/ml, e meia-vida final de 115h. Concentrações plasmáticas de ravuconazol têm sido mantidas por mais de quatro vezes o CIM<sub>90</sub> para *C. neoformans* (0,25 µg/ml) do dia 4 ao dia 31, seguidos administração de 400mg/dia por 14 dias (YAMAZUMI et al., 2000).

O mecanismo de ação do ravuconazol é similar ao do itraconazol, mas apresenta uma capacidade fungicida frente a algumas espécies de *Aspergillus*, *Candida*, *Trichophyton*, *Microsporum* e hifomicetos hialinos, e que no caso do *C. neoformans* é superior ao do voriconazol e itraconazol (MUÑOZ, BRIÓ & QUINDÓS, 2001).

Num estudo de Fung-Tomc et al. (1998), ravuconazol foi ativo contra *C.krusei*, mas foi inativo contra algumas cepas de *C. tropicalis*. Itraconazol, fluconazol e ravuconazol foram ativos contra *C. neoformans* embora somente ravuconazol e itraconazol foram fungicidas para esta espécie. Ravuconazol é um novo triazólico que é dois a quatro vezes mais potente que itraconazol e 40 vezes mais ativo que fluconazol contra algumas espécies de fungos.

Segundo Yamazumi et al. (2000), ravuconazol sendo melhor que itraconazol, sendo altamente ligado às proteínas (98%), tendo favoráveis propriedades farmacocinéticas e melhor potência, sugere-se que ravuconazol pode ser usado para o tratamento de doenças infecciosas devido a *C. neoformans*.

Tem um amplo espectro antifúngico, incluindo *Candida albicans* e *Candida não albicans*, *T. beigelli*, *Criptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*, e potente ação antifúngica *in vitro*, superior aos correntemente avaliados triazólicos e anfotericina B (HATA et al., 1996a). Em modelos animais com infecções fúngicas evasivas, tem eficácia contra ambas candidíases sistêmica e pulmonar e cryptococose comparável ao do fluconazol e atividade superior em aspergilose sistêmica e pulmonar, quando comparável ao itraconazol em alguns modelos (HATA et al., 1996b).

Atividades do ravuconazol e voriconazol foram comparadas com as da anfotericina B, 5-fluorocitosina, itraconazol e fluconazol, e comprovou-

se maior eficácia frente a estes antifúngicos citados contra todas as *Candidas* spp e foram somente estes novos agentes com boa atividade contra *C. krusei* (PFALLER et al., 2002).

Tem mostrado eficácia em candidemias de pacientes imunocomprometidos, e onicomicoses em pacientes saudáveis (GUPTA & TOMAS, 2003). Particularmente em idosos, a *C. glabrata* tem aparecido como potente causa de resistência antifúngica e causa de candidemia e ravuconazol tem-se mostrado eficiente (DIEKEMA et al., 2002).

Em um estudo de Pfaller et al. (1999), demonstrou que cepas de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol são suscetíveis tanto para os novos triazólicos - entre eles o ravuconazol - e agentes antifúngicos equinocandinas, similarmente ao observado para *C. albicans*.

### **2.5.3 Micafungina**

É um agente antifúngico inibidor da síntese da  $\beta$ - (1,3) - glucana sintetase (FK-463); um inibidor da síntese da glucana, uma nova classe de agentes antifúngicos (GHANNOUM & RICE, 1999).

É uma nova droga antifúngica administrada via parenteral, estando em estudo clínico fase III. É um derivado semi-sintético do FR-901379, hexapeptídeo cíclico solúvel em água, com uma cadeia lateral acil gordurosa (para melhorar a potência fúngica), similares em estrutura com a classe equinocandinas dos agentes antifúngicos (MIKAMO, SATO & TAMAYA, 2000).



Dos três grupos de compostos (aculeacina, equinocandina e papulocandina) que são inibidores fúngicos específicos da  $\beta$  - (1-3) - glucana sintetase, somente equinocandinas são agentes ativos nos ensaios clínicos para avaliar seus efeitos, tolerabilidade e eficácia contra candidíase. Dentre elas se destacam a aparição da caspofungina, anidulafungina e micafungina. Equinocandinas como são lipopeptídeos tem atividade fungicida *in vitro* e *in vivo* contra espécies de *Candida* e *Aspergillus*. Estes compostos inibem a síntese de compostos da estrutura da glucana, sem afetar ácidos nucleicos (GHANNOUM & RICE, 1999; MUÑOZ, 2001). *In vitro* e *in vivo*, as equinocandinas são rapidamente fungicidas contra maioria *C. spp* e fungistáticas contra *Aspergillus spp*. Não há atividade em concentrações clinicamente relevantes contra *Zygomycetos*, *Criptococcus neoformans*, ou *Fusarium spp* (DENNING, 2003).

O mecanismo de ação é diferente do mecanismo de ação da anfotericina B e dos compostos azólicos. O local de ação é a parede celular, não a membrana celular e não afeta células de mamíferos as quais não contém  $\beta$  - (1-3) -D-glucana. O fato do local de ação e alvo serem diferentes da anfotericina B e azólicos podem resultar em atividade contra cepas de fungos resistentes; atividade aditiva quando combinado com outros agentes; melhor tolerabilidade graças à probabilidade reduzida de toxicidade relacionada ao mecanismo de ação (TAWARA et al., 2002; GHANNOUM & RICE, 1999).

Inibidores da  $\beta$ -glucana atuam como inibidores não-competitivos específicos da  $\beta$  - (1-3) -D-glucana-sintetase, uma proteína de membrana. Estes compostos têm efeito secundário em outros componentes de células intactas incluindo a redução no ergosterol e lanosterol e um aumento na quitina da parede celular. A inibição da enzima resulta em mudanças citológicas e estruturais no fungo pelo crescimento de

pseudohifas, espessamento da parede celular, separação dos brotamentos da célula mãe e conduz a uma instabilidade osmótica que culmina com a lise da célula fúngica (GHANNOUM & RICE, 1999).

Num estudo de Tawara et al. (2002) demonstraram que a atividade e espectro antifúngico *in vitro* de micafungina quando comparados com anfotericina B, fluconazol e itraconazol, exibiu amplo espectro de atividade contra importantes patógenos clínicos incluindo espécies de *Candida* e de *Aspergillus*. Foi também potencialmente ativo contra *C. albicans* resistentes a azólicos bem como grupos suscetíveis a azólicos e não há resistência cruzada com azóis. Não tem atividade contra *C. neoformans*, *Trichosporum sp* ou *Fusarium solani*. Resultados de avaliações pré-clínicas *in vitro* mostraram ser um potente agente antifúngico parenteral (MIKAMO, SATO & TAMAYA, 2000).

Em pacientes HIV positivos, micafungina intravenosa 50-150 mg/dia dose-dependente erradicou candidíase orofaríngea confirmada endoscopicamente; com micafungina 100 e 150 mg/dia foi mais efetivo do que com micafungina 50 mg/dia e tão efetivo quanto fluconazol 200 mg/dia em ensaio duplo-cego. Em ensaios não-cegos, micafungina (monoterapia ou combinação terapia) foi efetiva contra aspergilose invasiva, candidíase e candidemia em pediatria e pacientes adultos com diagnóstico recente ou infecção refratária. Taxas de sucesso foram de 80%.

Micafungina é geralmente bem tolerada. Efeitos adversos não foram relacionados com doses - ou infusão - com micafungina 12,5-900 mg/dia; não ocorreu reação alérgica. Os efeitos adversos geralmente são leves, incluindo febre, testes de função hepática anormais e leve hemólise. Pouca absorção após administração oral limita o uso em via intravenosa. Interações medicamentosas são poucas. Micafungina foi tão

bem tolerada como fluconazol, com menos receptores descontinuando tratamento (JARVIS et al., 2004; DENNING, 2003).

Infecções fúngicas são comuns em recém-nascidos, especialmente em neonatos prematuros, e são responsáveis por considerável morbidade e mortalidade. Correntemente, três classes de antifúngicos são usados em tratamentos de infecções fúngicas sistêmicas em neonatos: os macrolídeos polienos (anfotericina B [também em preparações lipídicas]); os azóis (fluconazol); e as pirimidinas fluorinadas (flucitosina). As equinocandinas (caspofungina e micafungina) são uma nova classe de antifúngicos que mostra ser promissora para esta população. Mas ainda até esta data não se têm dados suficientes para definir o perfil farmacocinético, dose ótima ou duração da terapia, ou toxicidade para algum destes compostos em neonatos. Além disso, estudos contínuos são necessários para otimizar a terapia antifúngica nesta população (FRATTARELLI et al., 2004).

## **2.6 PROVAS DE SUSCETIBILIDADE COM ANTIFÚNGICOS *IN VITRO***

### **2.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

As técnicas utilizadas na execução de antibiogramas para fungos têm sido adaptações daquelas tradicionalmente empregadas para bactérias. Compreendem basicamente: diluição em caldo, diluição em ágar e difusão em ágar (SHADOMY & PFALLER, 1991).

A técnica de diluição em caldo consiste na preparação de diferentes concentrações do antifúngico em meio líquido, ao qual adiciona-se o inóculo do fungo em estudo (KRCMÉRY et al., 1992). Na

técnica de diluição em ágar, cada concentração do antifúngico é adicionada ao meio fundido, e a mistura é distribuída em tubos de ensaio ou em placas de Petri. Após geleificação do meio, o inóculo é semeado na superfície do mesmo (SHADOMY & PFALLER, 1991; REX et al., 1993). Os resultados obtidos, a partir das técnicas de diluição, podem ser expressos em termos de concentração inibitória mínima (CIM), considerada como a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento do microrganismo (SHADOMY & PFALLER, 1991; REX et al., 1993).

A técnica de difusão em ágar fundamenta-se no fato de que, um microrganismo, semeado na superfície de um meio de cultivo, pode ter seu crescimento inibido pela droga que se difunde radialmente no meio, a partir de um reservatório. Este pode ser uma escavação no ágar, que conterá certo volume da solução da droga em estudo, ou discos ou tabletes, impregnada com a droga e depositada sobre a superfície do meio. Depois de determinado período de incubação, as zonas de inibição do crescimento em volta do reservatório são medidas e relacionadas à sensibilidade do fungo. A comprovação de existência de sensibilidade depende do critério adotado (WORKING PARTY OF THE BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY, 1995; SHADOMY & PFALLER, 1991).

### **2.6.2 Técnica atualmente preconizada**

Até recentemente, os testes de suscetibilidade para leveduras não eram julgados necessários, porque a maioria das espécies consideradas clinicamente importantes, era sensível a anfotericina B. Com o advento de

antifúngicos sistêmicos menos tóxicos, além do acentuado aumento de infecções fúngicas oportunistas e dos crescentes relatos de resistência aos antifúngicos, ficou estabelecida a importância de se dispor de um teste de suscetibilidade padrão, capaz de prever o sucesso da terapêutica instituída (REX et al., 1993; GALGANI et al., 1992).

Nestas circunstâncias, o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), estabeleceu um grupo para estudar diversos fatores envolvidos com uma série de problemas, como: as características biológicas dos fungos, as propriedades físico-químicas dos antifúngicos e, sobretudo, as condições técnicas (GALGANI et al., 1992).

O estudo foi centrado nas leveduras, por apresentarem menor complexidade do que os bolores, e na determinação da CIM de diversos antifúngicos. Em dezembro de 1992, o NCCLS publicou os resultados dessas pesquisas sob a forma de um documento codificado como M27-P. Este inclui proposta de uma metodologia padronizada, empregando-se a técnica de diluição em caldo (REX et al., 1993; NCCLS, 1992).

A M27-A, utilizada como ponto de referência, tem possibilitado investigações sobre técnicas alternativas mais econômicas, facilmente exeqüíveis e de leitura final mais objetiva (COLOMBO et al., 1995; OLLERT et al., 1995; PFALLER et al., 1995; SUGAR & LIU, 1995; TIBALLI et al., 1995b).

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 MICRORGANISMOS**

#### **3.1.1 Procedência**

As espécies de *Candida* foram isoladas de diversas amostras biológicas, incluindo sangue, secreção vaginal, unhas, pele e urina, num total de 110 isolados, obtidos de pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). As culturas de *Cryptococcus neoformans* eram provenientes de casos de meningoencefalite criptocócica em pacientes com SIDA (40 amostras), obtidas de pacientes internados do HUSM e outras provenientes de nichos arbóreos (15 amostras), de árvores de eucalipto, os quais foram cedidos pelo Laboratório de Epidemiologia de Fungos de Importância Médica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As cepas utilizadas como referência foram *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida dubliniensis* ATCC CBS7987, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida lusitanae* ATCC 66035, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida krusei* ATCC 6258, *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012.

### **3.1.2 Isolamento e identificação**

Foram adotados procedimentos clássicos, usualmente realizados em laboratório clínico (ISENBERG, 1992).

### **3.1.3 Seleção das leveduras**

Após identificação, foram selecionadas as pertencentes ao gênero *Candida* e nestas condições, foram incluídas, neste estudo, 30 cepas de *C. albicans*, 20 cepas de *Candida dubliniensis*, 30 de *C. tropicalis*, 10 de *C. lusitanae*, 15 de *C. glabrata*, 5 de *C. krusei* e também as pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, sendo que destes, 40 foram de origem clínica e 15 de origem ambiental.

## **3.2 MEIOS DE CULTURA**

### **3.2.1 Meios de cultura utilizados para o isolamento de leveduras (ISENBERG, 1992)**

#### **3.2.1.1 Ágar Sabouraud Dextrose (ASD)**

Composição:

Peptona.....	10 g
Dextrose.....	20 g
Ágar.....	15 g
Água destilada.....	1.000ml

Preparação:

Os componentes sólidos, pesados, eram transferidos para um balão e dissolvidos em água destilada. O meio foi esterilizado em autoclave a 120°C durante 15 minutos, e distribuído em placas de Petri esterilizadas.

### **3.2.2 Meio de cultura utilizado para manutenção das cepas de leveduras isoladas (ISENBERG, 1992)**

#### 3.2.2.1 Ágar Sabouraud Dextrose

Já referido em 3.2.1.1

### **3.2.3 Meios de cultura utilizados para a identificação das leveduras isoladas (ISENBERG, 1992)**

#### 3.2.3.1 Ágar Sabouraud Dextrose, enriquecido com extrato de levedura

Composição:

Peptona.....	10 g
Extrato de levedura.....	5 g
Dextrose.....	20 g
Ágar.....	20 g
Água destilada.....	1.000ml



#### Preparação:

O ágar foi adicionado à água destilada e esta mistura aquecida até a fusão do ágar, e, a seguir, adicionaram-se à peptona e a dextrose. Após homogeneização, o meio foi distribuído em tubos de ensaio, esterilizado em autoclave a 120°C durante 15 minutos, e solidificado em posição inclinada.

#### 3.2.3.2 Meio para prova de assimilação de fontes de carbono (ISENBERG, 1992)

#### Composição:

Sulfato de amônio.....	5g
Fosfato monobásico de potássio.....	1g
Sulfato de magnésio 7H <sub>2</sub> O.....	0,5g
Ágar.....	15 g
Água destilada.....	1.000ml

#### Preparação:

O ágar foi adicionado a uma parte de água destilada, sob agitação, e a mistura aquecida até fusão do ágar. A seguir, foram adicionados os demais componentes previamente dissolvidos a quente na água destilada restante. Após homogeneização, volumes de 18ml do meio foram distribuídos em tubos e esterilizados em autoclave a 120°C, durante 15 minutos.

3.2.3.3 Meio para provas de assimilação de fontes de nitrogênio  
(ISENBERG, 1992)

Composição:

Dextrose.....	20g
Fosfato monopotássico.....	1g
Sulfato de magnésio 7H <sub>2</sub> O.....	0,5g
Ágar.....	15g
Água destilada.....	1.000ml

Preparação:

O ágar foi adicionado a uma parte de água destilada, sob agitação, e a suspensão aquecida até a fusão do ágar. A seguir foram adicionados os demais componentes previamente dissolvidos a quente na água destilada restante. Após homogeneização, volumes de 18ml do meio foram distribuídos em tubos, e esterilizados em autoclave a 120°C durante 15 minutos.

3.2.3.4 Meio de cultura para prova de fermentação de carboidratos  
(ISENBERG, 1992)

Composição:

Peptona.....	7,5g
Extrato de levedura.....	4,5g
Água destilada.....	1.000ml

Indicador pH = 7,0 a 7,2

Púrpura de bromocresol.....1,6g

Álcool 95%.....10ml

#### Preparação:

Os componentes sólidos foram dissolvidos na água destilada e, quando necessário, o pH do meio foi ajustado a 7,0 a 7,2 com solução de hidróxido de sódio 0,1 N. Após adição de 1% do indicador e homogeneização, o meio foi eqüitativamente distribuído em balões. A cada balão, foi adicionado um dos seguintes carboidratos: dextrose, d-galactose, lactose, maltose, sacarose, e trealose em quantidades suficientes para concentrações finais de 4%.

O meio foi distribuído em quantidades aproximadas de 3,5ml em tubos 13 mm x 100 mm, contendo tubos de Durham em posição invertida. Os tubos de ensaio foram codificados para diferenciar os substratos, e esterilizados em autoclave a 120°C durante 15 minutos. A fim de evitar a hidrólise ou caramelização dos açúcares, a válvula da autoclave foi rapidamente aberta após a esterilização e os tubos retirados e esfriados em banho de gelo.

#### 3.2.3.5 Ágar fubá com Tween 80

#### Composição:

Fubá de milho amarelo.....40g

Ágar.....20g

Tween 80.....10ml

Água destilada.....1.000ml

#### Preparação:

O fubá foi adicionado a 800ml da água destilada e aquecido em banho de água a 60°C, durante 1 hora. Em seguida foi filtrado através de gaze, o volume completado para 1.000ml, adicionando o ágar e submetido ao aquecimento até completa dissolução dos componentes. Após a fervura, o Tween 80 foi acrescentado na concentração final de 1%, homogeneizado, distribuído em tubos, e esterilizados em autoclave a 120°C durante 15 minutos.

### **3.3 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS E PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS**

Após avaliação macroscópica, as colônias foram semeadas em tubos contendo ASD e mantidas à temperatura ambiente, com repiques periódicos. Para a realização das provas subseqüentes foram utilizadas como inóculos culturas desenvolvidas em ágar Sabouraud dextrose, durante 24 horas a 30°C.

### **3.4 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS**

#### **3.4.1 Características micromorfológicas**

Foram pesquisadas as seguintes características microscópicas das leveduras isoladas: presença de brotamento, pseudomicélio, micélio verdadeiro, clamidósporo e artrósporo. Esses elementos foram estudados pelo método de cultura sobre lâmina, utilizando-se o ágar fubá com Tween 80. A microcultura foi incubada a 25°C e examinada diariamente durante 5 dias.

#### **3.4.2 Formação de tubos germinativos**

Inóculos de leveduras foram suspensos em cerca de 0,5 ml de soro humano e inoculados em banho de água a 37°C. Após uma hora, foram preparadas montagens entre lâmina e lamínula, para pesquisa de tubos germinativos. As suspensões cujos resultados foram negativos permanecem sob incubação durante mais de 2 horas. Após esse período, realizaram-se novas pesquisas e as suspensões com ausência dessas estruturas foram consideradas definitivamente negativas.

#### **3.4.3 Produção de ascósporos**

As leveduras foram repicadas sobre a superfície dos meios de Gorodkova e acetato de Kleyn, e incubadas a 25°C durante 24 dias. Após esse período, os ascósporos foram pesquisados microscopicamente em

preparações diretas a fresco e coradas pelo método de Wirtz. As culturas permaneceram sob incubação e foram reavaliadas até completarem 1 mês.

#### **3.4.4 Pigmentação de *C. neoformans***

As amostras foram semeadas em ágar semente de níger (dextrose 10g; creatina 780mg; extrato semente de níger 200ml; ágar bacteriológico 20g; água destilada 80 ml), incubadas a 37° C durante 5 dias e a produção de pigmento observada pelo escurecimento das colônias.

#### **3.4.5 Detecção da cápsula polissacarídica**

Este teste constitui-se no exame microscópico das leveduras em uma suspensão diluída de tinta da Cjhina. As partículas da tinta são excluídas pela cápsula, que então aparece como uma área clara ao redor da célula leveduriforme.

### **3.4.6 Características bioquímicas**

Para observação dessas características, as leveduras foram submetidas às seguintes provas: assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e fermentação de carboidratos. Para as leveduras, cuja identificação não se completou por meio dessas provas, foram pesquisadas características adicionais, incluindo-se a hidrólise da uréia e a produção de ácidos.

### **3.4.7 Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio**

Preparou-se uma suspensão de leveduras em água destilada esterilizada, com turvação equivalente ao padrão 4 da escala McFarland, e transferiu-se o volume de 2ml para uma placa de Petri esterilizada. A seguir, adicionou-se o volume de 18ml do meio isento de fontes de carbono ou nitrogênio, fundido e esfriado a aproximadamente 45°C. Após homogeneização e solidificação, pequenas alíquotas das substâncias nitrogenadas ou carbonadas foram depositadas em pontos equidistantes de referência previamente marcada na parte externa da base da placa.

Esta foi incubada a 30°C, e os resultados avaliados entre 1 e 2 dias. A prova foi considerada positiva quando havia um halo de crescimento ao redor do ponto de aplicação da substância carbonada ou nitrogenada, e negativa na ausência desse halo.

Foram empregadas as seguintes fontes de carbono: celobiose, dextrose, d – galactose, inositol, lactose, maltose, rafinose e sacarose. Para as leveduras cuja identificação não foi conclusiva frente a esses

carboidratos, foram realizadas outras provas, com inclusão de ácido succínico, amido solúvel, L – arabinose, eritritol, glucitol, manitol, melibiose, melizitose, L – ramnose, ribitol, salicina, trealose e L-xilose.

O nitrato de potássio e a peptona foram utilizados como fontes de nitrogênio.

### **3.4.8 Assimilação de nitrato**

Para a determinação da assimilação de nitrato nas colônias viáveis dos isolados testados, foram obtidas a partir de meio Sabouraud dextrose após 24–48 horas de incubação. Os *swabs* utilizados para a coleta das colônias foram previamente imersos em meio contendo: KNO<sub>3</sub> 0,5G; NaHPO<sub>4</sub> 2,925 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,285 g; Tween 80 2,275 ml; água destilada qsp 1000 ml. Após imersão no meio de cultura os *swabs* foram levados ao dessecador por 24 horas, autoclavados com as pontas cobertas com papel alumínio e mantidos no dessecador até o momento do uso.

Para a coleta das colônias de leveduras os *swabs* foram pressionados contra estas para que as células penetrassem por entre as fibras de algodão e incubados à 45° C por 10 minutos em tubo de vidro estéril. A cada tubo foram adicionadas 2 gotas de cada um dos reagentes: ácido sulfanílico 5N em ácido acético glacial e  $\alpha$  - naftilamina 5N em ácido acético glacial. Como resultado positivo padronizou-se o desenvolvimento de coloração avermelhada em cerca de 30 segundos.



### **3.4.9 Produção de urease**

Para o teste de produção de urease uma colônia da cultura foi inoculada no meio de uréia ágar base (peptona 1g; glicose 1g; NaCl 5g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g; uréia 20g; vermelho de fenol 0,012g; ágar 20g; água destilada qsp 100ml; pH 6,8). O meio contendo o inóculo foi incubado a 30° C e examinado durante um período de quatro dias. A troca da coloração amarela do meio de cultura para a coloração rosa ou vermelha denotou reação positiva devido à alcalinização do meio, visualizada pelo indicador de pH vermelho de fenol. A reação positiva indicou a produção de urease.

### **3.4.10 Determinação das variedades de *C. neoformans***

Para a identificação das variedades de *C. neoformans* foi utilizado o meio canavanina-glicina-azul de bromotimol (glicina 10g; fosfato de potássio monobásico 1g; sulfato de magnésio 1g; sulfato de L-canavanina 30mg; azul de bromotimol 0,4g; hidróxido de sódio 0,01N 64ml; NaOH 0,04g; água destilada 1100ml). As amostras foram semeadas neste meio e incubadas. *C. neoformans* variedade *neoformans* não se desenvolve neste meio, entretanto, a variedade *gattii* cresce bem na presença de glicina, modificando a cor do meio para azul cobalto num período de 48 horas a 5 dias.

### **3.5 TESTES DE SUSCETIBILIDADE (NCCLS M27-A, 1997)**

Determinou-se a suscetibilidade das amostras frente aos antifúngicos de acordo com a técnica M27-A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS Documento M27-A, 1997).

Os antifúngicos incluídos neste estudo foram: fluconazol (Pfizer), ravuconazol (Bristol-Myers-Squibb), albaconazol (UR-9825, Laboratories Uriach) e micafungina (FK-463, Fujisama Pharmaceutical CO), foram obtidos de seus respectivos fabricantes.

#### **3.5.1 Soluções estoques dos agentes antifúngicos**

As soluções estoques dos antifúngicos foram preparadas para se obter concentrações finais de 5120 $\mu$ g/ml. Fluconazol e micafungina foram diluídas em água destilada estéril e ravuconazol e albaconazol em dimetilsulfóxido. Volumes de 1ml de cada uma das soluções foram distribuídos em tubos de ensaio (15 mm x 140 mm) com tampa de rosca. Estes tubos foram mantidos a – 20°C ao abrigo da luz, por um período de até seis meses.

### **3.5.2 Diluição, distribuição e controle dos agentes antifúngicos**

A partir das soluções estoques, diluições ao dobro foram preparadas para se obter concentrações finais de 0,03 a 2,0 µg/ml para ravuconazol, 0,015 a 0,5 µg/ml para albaconazol e micafungina e 1,0 a 64 µg/ml para fluconazol, do antifúngico em caldo RPMI 1640 tamponado com MOPS.

Volumes de 0,1ml de cada diluição do antifúngico foram distribuídos em tubos de ensaio (10mm x 75mm). Para controle de crescimento utilizou-se o caldo RPMI 1640 tamponado, isento de drogas, distribuído em volumes de 0,9 ml, e conservados a – 10°C até o momento do uso.

### **3.5.3 Preparação do inóculo**

Inicialmente, a partir de cada cultivo, preparava-se uma suspensão em solução fisiológica contendo 0,05% de Tween 80. Com auxílio de alça bacteriológica quatro a cinco colônias de cada levedura com 48 horas de crescimento em ágar Sabouraud dextrose, foram transferidas para estes tubos e a suspensão resultante, homogeneizada. Em seguida, ajustada em espectrofotômetro a 530nm, a fim de se obter turvação de 90% de transmitância, equivalente a uma suspensão com  $1 \times 10^6$  células /ml.

Esta solução foi preparada 15 minutos antes do início do teste. No momento do uso, procedeu-se à diluição do inóculo em RPMI 1640, na proporção de 1:100 e esta proporção de 1:20, a fim de se obter inóculo com  $0,5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^3$  células /ml.

### **3.5.4 Execução da prova**

Volumes de 0,9ml do inóculo foram transferidos para tubos de ensaio que continham as diferentes concentrações dos antifúngicos (3.4.2) e para tubos de controle de crescimento, isentos de antifúngicos. A seguir os tubos foram incubados a 35°C, durante 48 horas. Posteriormente, procedeu-se a determinação da concentração inibitória mínima. Os testes eram realizados em duplicata.

### **3.5.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

#### **3.5.5.1 Leitura da CIM para os testes com azólicos**

Devido à ocorrência de inibição parcial, procederam-se diluições que permitissem evidenciar 80% de inibição. Nestas condições, 0,2ml do controle de crescimento sem droga foi diluído com 0,8ml de caldo RPMI 1640, e a turvação da suspensão resultante foi comparada com a dos tubos testes. Foi considerada CIM, a menor concentração do antifúngico que promoveu turvação igual ou menor que a do controle diluído. Após a incubação, os CIMs para fluconazol, micafungina, ravuconazol e albaconazol foram determinados como a menor concentração da droga que evidenciou 80% de inibição em relação a turvação dos controles positivos. Como cepas controle e de referência foram utilizadas: *Candida krusei* ATCC 6258 e a *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (NCCLS, 1997).

### 3.5.5.2 Leitura da CIM para os testes com micafungina

Similar aos da anfotericina B, ou seja, a menor concentração sem qualquer turvação.

### 3.5.6 Pontos de corte para definição da sensibilidade e resistência dos isolados (NCCLS, M27 – A)

De acordo com o documento M 27 – A, utilizou-se pontos definidos (Tabela 2).

Tabela 2 - Pontos de Corte

Antifúngico	Sensível	Sensível-dose-dependente	Resistente
Fluconazol	≤ 8,0 µg/ml	16 – 32 µg/ml	≥ 64 µg/ml
Ravuconazol*	< 1,0 µg/ml	—	≥ 1,0 µg/ml
Albaconazol*	< 1,0 µg/ml	—	≥ 1,0 µg/ml
Micafungina*	< 1,0 µg/ml	—	≥ 1,0 µg/ml

\* Estes agentes investigados não têm fixados pontos de corte para a interpretação de sensibilidade de leveduras a estas drogas. Na intenção de comparação tem-se empregado suscetibilidade < 1,0 µg/ml para estes valores (PFALLER et al, 1995).

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os resultados (CIMs) obtidos com os diferentes grupos de leveduras do gênero *Candida*, foram realizadas mediante a aplicação do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) (DORIA FILHO, 1999).

As comparações entre amostras clínicas e ambientais de *Cryptococcus neoformans* foram realizadas mediante aplicação de análise de variância usando o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), nível de confiança 95%. As operações foram realizadas através do programa estatístico STATGRAPHICS – PLUS versão 5,0 (2000).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 TESTES DE SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS

#### 4.1.1 Suscetibilidade de *Candida spp* frente ao fluconazol

De modo geral, o espectro de suscetibilidade variou entre 1,0 e 64  $\mu\text{g/ml}$ .

*C. albicans* apresentou espectro similar, destacando-se a CIM<sub>50</sub> de 8,0  $\mu\text{g/ml}$ , CIM<sub>90</sub> de 32  $\mu\text{g/ml}$  e 6,6% dos isolados sendo resistente a este azólico.

*Candida dubliniensis* evidenciou um espectro variável entre 1,0 e 4,0  $\mu\text{g/ml}$ , com CIM<sub>90</sub> de 4,0  $\mu\text{g/ml}$  e todos os isolados sensíveis.

*Candida tropicalis* apresentou perfil semelhante a *C. albicans* (1,0 - 64 $\mu\text{g/ml}$ ) com CIM<sub>50</sub> de 4,0  $\mu\text{g/ml}$ , CIM<sub>90</sub> de 16,0  $\mu\text{g/ml}$  e com 3,3% dos isolados sendo resistentes a este azólico.

*C. lusitaniae* apresentou perfil de 1,0 – 4,0  $\mu\text{g/ml}$  com todos os isolados sensíveis; *Candida glabrata* demonstrou bandas variáveis entre 1,0 - 16  $\mu\text{g/ml}$ , mas com CIM<sub>90</sub> de 8,0  $\mu\text{g/ml}$ , e apenas 1 cepa foi sensível dose-dependente.

*Candida krusei* apresentou um perfil entre 8-16µg/ml com CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> de 16µg/ml, ou seja, sensível dose-dependente.

As comparações entre os grupos de *Candida albicans* x *Candida* não *albicans* não evidenciou diferença significativa (p> 0,05).

A tabela 3 evidencia estes resultados.

Tabela 3 - Suscetibilidade de *Candida spp* frente ao fluconazol (CIMs)

Espécies	n	Nº de cepas sensíveis às concentrações (µg/ml) de:							CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
		1	2	4	8	16	32	64		
<i>C. albicans</i>	30	0	1	7	9	5	6	2	8,0	32
<i>C. dubliniensis</i>	20	7	8	5					2,0	4,0
<i>C. tropicalis</i>	30	5	7	10	4	2	1	1	4,0	16,0
<i>C. lusitanae</i>	10	4	4	2					2,0	4,0
<i>C. glabrata</i>	15	7	5	1	1	1			2,0	8,0
<i>C. krusei</i>	5				2	2			16	16,0

CIM = Concentração inibitória mínima

CIM<sub>50</sub> = Concentração inibitória mínima para 50% das amostras

CIM<sub>90</sub> = Concentração inibitória mínima para 90% das amostras



#### 4.1.2 Suscetibilidade de *Candida spp* frente ao ravuconazol

*Candida albicans* exibiu um perfil de suscetibilidade variável entre 0,03 - 0,5 µg/ml, com CIM<sub>50</sub> de 0,125 µg/ml e CIM<sub>90</sub> de 0,5 µg/ml. *C. dubliniensis*, *C. lusitanae* e *C. krusei* evidenciaram um perfil de suscetibilidade entre 0,03 e 0,125 µg/ml.

*C. tropicalis* evidenciou perfil entre 0,03 e 0,25 µg/ml similarmente, ao observado em *C. glabrata*.

A tabela 4 demonstra estes resultados salientando que nenhum isolado apresentou resistência (CIM ≥ 1,0 µg/ml); todavia 30% de *C. albicans*, 13,3% de *C. tropicalis* e 6,6% de *C. glabrata* foram classificadas como sensível dose-dependentes.

Comparando-se os grupos *Candida albicans* x *Candida* não *albicans* não foi evidenciada diferença significativa (p>0,05).

Tabela 4 – Suscetibilidade de *Candida spp* frente ao ravuconazol (CIMs)

Espécies	n	Nº de cepas sensíveis às concentrações (µg/ml) de:							CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
		0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2		
<i>C. albicans</i>	30	3	10	5	8	4			0,125	0,5
<i>C. dubliniensis</i>	20	9	9	2					0,06	0,06
<i>C. tropicalis</i>	30	7	9	10	4				0,06	0,25
<i>C. lusitanae</i>	10	2	7	1					0,06	0,06
<i>C. glabrata</i>	15	3	9	2	1				0,06	0,125
<i>C. krusei</i>	5	1	3	1					0,06	0,125

CIM = Concentração inibitória mínima

CIM<sub>50</sub> = Concentração inibitória mínima para 50% das amostras

CIM<sub>90</sub> = Concentração inibitória mínima para 90% das amostras

#### 4.1.3 Suscetibilidade de *Candida spp* frente ao albaconazol

O espectro de suscetibilidade variou entre 0,015 – 0,25 µg/ml para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, com CIM<sub>50</sub> de 0,06 µg/ml e CIM<sub>90</sub> de 0,125 µg/ml. *C. dubliniensis* apresentou um espectro de suscetibilidade entre 0,015 e 0,06 µg/ml, com CIM<sub>50</sub> de 0,03 µg/ml e CIM<sub>90</sub> de 0,06 µg/ml.

*C. lusitaniae* apresentou perfil e CIMs semelhantes à *C. dubliniensis*.

*C. krusei* evidenciou perfil entre 0,015 a 0,125 µg/ml com CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> de 0,125 µg/ml e considerados sensível.

Comparando-se os grupos *Candida albicans* x *Candida* não *albicans* não foi evidenciada diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

A tabela 5 evidencia estes resultados.

Tabela 5 - Suscetibilidade de *Candida spp* frente ao albaconazol (CIMs)

Espécies	n	Nº de cepas sensíveis às concentrações (µg/ml) de:						CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
		0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5		
<i>C. albicans</i>	30	5	6	10	8	1		0,06	0,125
<i>C. dubliniensis</i>	20	6	10	4				0,03	0,06
<i>C. tropicalis</i>	30	3	11	7	7	2		0,06	0,125
<i>C. lusitaniae</i>	10	1	8	1				0,03	0,03
<i>C. glabrata</i>	15	1	3	8	2	1		0,06	0,125
<i>C. krusei</i>	5	0	1	1	3			0,125	0,125

CIM = Concentração inibitória mínima

CIM<sub>50</sub> = Concentração inibitória mínima para 50% das amostras

CIM<sub>90</sub> = Concentração inibitória mínima para 90% das amostras

#### 4.1.4 Suscetibilidade de *Candida spp* frente à micafungina

*Candida albicans* e *Candida tropicalis* exibiram perfil de suscetibilidade que variou entre 0,015 a 0,25 µg/ml com CIM<sub>50</sub> de 0,125 µg/ml para *C. albicans* e 0,06 µg/ml para *C. tropicalis* e CIM<sub>90</sub> de 0,25 µg/ml para *C. albicans* e 0,125 µg/ml para *C. tropicalis*.

Para *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata* e *C. krusei* o perfil de suscetibilidade variou de 0,015 a 0,125 µg/ml. Os CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> para elas foi de 0,06 µg/ml e 0,125 µg/ml respectivamente, com todas as espécies sensíveis a micafungina. A *C. glabrata* exibiu CIM<sub>50</sub> de 0,03 µg/ml e CIM<sub>90</sub> de 0,125 µg/ml, sendo também sensível a micafungina.

Comparando-se os grupos *Candida albicans* x *Candida* não *albicans* não foi evidenciada diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

A tabela 6 evidencia estes resultados.

Tabela 6 - Suscetibilidade de *Candida spp* frente à micafungina (CIMs)

Espécies	n	Nº de cepas sensíveis às concentrações (µg/ml) de:						CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
		0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5		
<i>C. albicans</i>	30	1	3	7	15	4		0,125	0,25
<i>C. dubliniensis</i>	20	2	4	7	7			0,06	0,125
<i>C. tropicalis</i>	30	1	10	9	8	2		0,06	0,125
<i>C. lusitaniae</i>	10	0	2	6	2			0,06	0,125
<i>C. glabrata</i>	15	3	5	4	3			0,03	0,125
<i>C. krusei</i>	5	0	2	2	1			0,06	0,125

CIM = Concentração inibitória mínima

CIM<sub>50</sub> = Concentração inibitória mínima para 50% das amostras

CIM<sub>90</sub> = Concentração inibitória mínima para 90% das amostras

Tabela 7 – Suscetibilidade e resistência das espécies de *Candida* frente aos antifúngicos testados

Espécies	n	Antifúngico	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )			%R
			Faixa	50	90	
<b><i>C. albicans</i></b>	30	Fluconazol	2,0-64	8,0	32	6,6
		Ravuconazol	0,03-0,5	0,125	0,5	-
		Albaconazol	0,015-0,25	0,06	0,125	-
		Micafungina	0,015-0,25	0,125	0,25	-
<b><i>C. dubliniensis</i></b>	20	Fluconazol	1,0-4,0	2,0	4,0	-
		Ravuconazol	0,03-0,125	0,06	0,06	-
		Albaconazol	0,015-0,06	0,03	0,06	-
		Micafungina	0,015-0,125	0,06	0,125	-
<b><i>C. tropicalis</i></b>	30	Fluconazol	1,0-64	4,0	16	3,3
		Ravuconazol	0,03-0,25	0,06	0,25	-
		Albaconazol	0,015-0,25	0,06	0,125	-
		Micafungina	0,015-0,25	0,06	0,125	-
<b><i>C. lusitaniae</i></b>	30	Fluconazol	1,0-4,0	2,0	4,0	-
		Ravuconazol	0,03-0,125	0,06	0,06	-
		Albaconazol	0,015-0,06	0,03	0,03	-
		Micafungina	0,03-0,125	0,06	0,125	-
<b><i>C. glabrata</i></b>	15	Fluconazol	1,0-16	2,0	8,0	-
		Ravuconazol	0,03-0,25	0,06	0,125	-
		Albaconazol	0,015-0,25	0,06	0,125	-
		Micafungina	0,015-0,125	0,03	0,125	-
<b><i>C. krusei</i></b>	5	Fluconazol	8,0-16,0	16	16	-
		Ravuconazol	0,03-0,125	0,06	0,125	-
		Albaconazol	0,03-0,125	0,125	0,125	-
		Micafungina	0,03-0,125	0,06	0,125	-

#### 4.1.5 Suscetibilidade de *Cryptococcus neoformans* de origem clínica e ambiental, frente ao fluconazol

Os isolados de origem clínica evidenciaram perfis de suscetibilidade entre 1,0 e 32  $\mu\text{g/ml}$ , todavia o maior número de cepas requereram baixas concentrações de fluconazol para serem inibidas.

As concentrações de fluconazol requeridas para inibirem as amostras de origem clínica foram similares as de origem ambiental, todavia as de origem ambiental foram mais suscetíveis. As CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> de ambos os grupos foram de 4,0  $\mu\text{g/ml}$  e de 8,0  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

A análise estatística não revelou diferenças significativas na suscetibilidade entre os grupos ( $p > 0,05$ ) e, de acordo com os critérios da M27-A, todos os isolados foram considerados sensíveis ao fluconazol.

A tabela 8 evidencia estes resultados.

Tabela 8- Suscetibilidade de *Cryptococcus neoformans*, de origem clínica e ambiental, frente ao fluconazol (CIMs)

Espécies	n	Nº de cepas sensíveis às concentrações ( $\mu\text{g/ml}$ ) de:						CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
		1	2	4	8	16	32		
<i>C. neoformans</i> (Clínica)	40	12	6	10	8	3	1	4,0	8,0
<i>C. neoformans</i> (Ambiental)	15	2	5	4	3	1		4,0	8,0

CIM = Concentração inibitória mínima

CIM<sub>50</sub> = Concentração inibitória mínima para 50% das amostras

CIM<sub>90</sub> = Concentração inibitória mínima para 90% das amostras

#### 4.1.6 Suscetibilidade de *Cryptococcus neoformans* de origem clínica e ambiental, frente ao ravuconazol

Os isolados de origem clínica exibiram perfil de suscetibilidade de 0,03 a 0,25  $\mu\text{g/ml}$ , com CIM<sub>50</sub> de 0,06  $\mu\text{g/ml}$  e CIM<sub>90</sub> de 0,125  $\mu\text{g/ml}$ .

As de origem ambiental tiveram perfis de suscetibilidade de 0,03 a 0,125  $\mu\text{g/ml}$ , com CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> de 0,06  $\mu\text{g/ml}$ . As concentrações necessárias para inibirem as amostras de origem ambiental foram menores do que as requeridas para as de origem clínica.

Análise estatística não revelou diferenças significativas na suscetibilidade entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

A tabela 9 evidencia estes resultados.

Tabela 9 – Suscetibilidade de *Cryptococcus neoformans*, de origem clínica e ambiental, frente ao ravuconazol (CIMs)

Espécies	n	Nº de cepas sensíveis às concentrações (µg/ml) de:						CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
		0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1		
<i>C. neoformans</i> (Clínica)	40	6	20	12	2			0,06	0,125
<i>C. neoformans</i> (Ambiental)	15	3	11	1				0,06	0,06

CIM = Concentração inibitória mínima

CIM<sub>50</sub> = Concentração inibitória mínima para 50% das amostras

CIM<sub>90</sub> = Concentração inibitória mínima para 90% das amostras

Tabela 10 – Perfis de suscetibilidade de *Cryptococcus neoformans*, de origem clínica e ambiental, frente a fluconazol e ravuconazol.

Espécies	n	Antifúngico	CIM (µg/ml)			
			Faixa	50%	90%	%R
<i>C. neoformans</i> (Clínica)	30	Fluconazol	1,0-32	4,0	8,0	-
		Ravuconazol	0,03-0,25	0,06	0,125	-
<i>C. neoformans</i> (Ambiental)	20	Fluconazol	1,0-16	4,0	8,0	-
		Ravuconazol	0,03-0,125	0,06	0,06	-

## 5 DISCUSSÃO

Espécies de *Candida* são os patógenos fúngicos emergentes mais importantes. A candidemia é encontrada aproximadamente em 8% dos hemocultivos nos hospitais, e em muitos centros, *Candida spp* é o quarto organismo mais frequentemente isolado. Por outro lado, o aparecimento de cepas distintas de *Candida albicans* - que supõe serem 50% dos isolados em muitos centros - e a presença de cepas resistentes aos azóis, desta e de outras espécies, converte este microorganismo em uma fonte de intensa preocupação, principalmente com o surgimento de espécies novas como a *C. dubliniensis* (MEIS et al., 1999). No presente estudo foi detectada presença de cepas resistentes aos azóis e a presença da nova espécie de *C. dubliniensis*.

A criptococose teve significativo aumento nos últimos anos, correspondendo ao aumento da população de imunossuprimidos, principalmente pacientes com SIDA, onde acomete 6 a 10% destes indivíduos (MITCHELL & PERFECT, 1995; SIDRIM & MOREIRA, 1998). Epidemiologicamente, as amostras clínicas, isoladas de pacientes com SIDA, aqui estudadas, pertenciam à variedade *neoformans*, o que está de acordo com os dados da literatura (IMWIDHAYA et al., 1989; ROZENBAUM et al., 1990; CHANDRESEKAR et al., 1994; DUPONT et al., 2000).

## 5.1 SUSCETIBILIDADE DE *Candida spp* FRENTE AO FLUCONAZOL

Pode-se dizer que quanto mais se usa fluconazol no hospital, maior o risco de ocorrer candidemia por espécies que são resistentes a este medicamento. Dados do Hospital Universitário da UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro), de 1998 a 2001, relatam o aumento do uso do fluconazol de 27% para 78% das prescrições, neste período. Com isto, houve uma redução importante na frequência de candidemia por *Candida albicans*, mas um aumento de quatro vezes de candidemia por *Candida glabrata* (NUCCI, 2003; COLOMBO, 2003). Enquanto *C. albicans* ainda é o maior patógeno, a frequência de *Candida* não-*albicans* está aumentando (NGUYEN et al., 1996), especialmente nas “fluconazol-problema”, as espécies que apresentam sensibilidade dose-dependente, e as espécies resistentes, especificamente *Candida glabrata*, que é uma espécie emergente em várias partes do mundo (NUCCI, 2003; COLOMBO, 2003). Estes dados vêm de encontro aos nossos achados, uma vez que tivemos espécies não-*albicans* resistentes, como *C. tropicalis*, e dose-dependente, como *C. glabrata* e *C. krusei*.

O aumento no registro de infecções fúngicas por espécies não-*albicans* ocorreu em diversos serviços de saúde do mundo todo. Considerando a evolução dos agentes causadores de candidemia em pacientes hospitalizados nos Estados Unidos e Holanda é possível verificar esta tendência de aumento de espécies não-*albicans*, particularmente de infecções causadas por *C. glabrata*. Alguns autores argumentam que o aumento de infecções por *C. glabrata* e *C. krusei* em países do hemisfério norte estaria relacionado à pressão seletiva do uso de fluconazol, visto que tais leveduras são primariamente menos sensíveis ou resistentes a esse triazólico. Já em países da América Latina, há predominância de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* entre as espécies não-*albicans*, espécies estas geralmente sensíveis ao



fluconazol. No Brasil, através do primeiro estudo multicêntrico em hospitais universitários, estas características epidemiológicas foram confirmadas (NUCCI et al., 1999; COLOMBO et al., 1999 e 2003). Estes dados confirmam a epidemiologia vista neste trabalho quando analisamos nossos resultados de forma estratificada, ou seja, em espécies *albicans* e não-*albicans*, onde evidenciamos o crescente aumento de cepas não-*albicans*.

## 5.2 SUSCETIBILIDADE DE *Candida spp* FRENTE AO RAVUCONAZOL

Num estudo de Pfaller; Diekema; Messer et al. (2004) foi demonstrada excelente atividade do ravuconazol (98% suscetibilidade com CIM  $\leq 1\mu\text{g/ml}$ ) contra espécies de *Candida spp*, incluindo patógenos oportunistas emergentes como *C. dubliniensis*. Em nossos resultados, os CIMs encontrados foram  $\leq 1\mu\text{g/ml}$ , confirmando os índices referendados (Tabela 4).

No presente estudo, todas as cepas de *Candida spp* foram sensíveis ao ravuconazol, inclusive *C. tropicalis*; *C. glabrata* teve um CIM<sub>90</sub> menor (0,125  $\mu\text{g/ml}$ ) do que *C. tropicalis* (0,25  $\mu\text{g/ml}$ ), o que sugere que ravuconazol tenha uma ação mais eficaz nas cepas de *C. krusei* (Tabela 4).

Ravuconazol aparenta ter melhor espectro anticandidemia do que itraconazol e fluconazol. Baseado nos CIMs<sub>90</sub>, itraconazol e fluconazol foram inativos contra cepas de *C. krusei* e *C. tropicalis*, comparados com ravuconazol, o qual foi ativo contra todas cepas de *C. krusei* testadas,

mas foi inativo contra algumas cepas de *C. tropicalis* (FUNG-TOMC et al., 1998).

Analisando os resultados entre fluconazol e ravuconazol, identificam-se melhor eficácia e atividade do ravuconazol frente às cepas de *Candida* testadas, pois se evidenciou que as cepas eram sensíveis a menores concentrações do ravuconazol; já com fluconazol (Tabela 3), necessitou de maiores concentrações do antifúngico para inibir as cepas de *Candida spp.* Estes resultados estão de acordo com os achados por Pfaller; Messer; Boyden et al. (2004), onde o ravuconazol foi 16 a 32 vezes mais potente que fluconazol contra cepas de *Candida spp* e constatou-se que fluconazol pode ser usado como um marcador para predizer sensibilidade e resistência para ravuconazol.

Em outro estudo de Pfaller; Diekema; Messer et al. (2004) referenciam o espectro estendido deste novo triazólico com potente atividade *in vitro* contra os raros e potencialmente patógenos emergentes, como *C. dubliniensis*. Esses achados ilustram o fato de que muitas das espécies menos comuns de *Candida* exibem baixa suscetibilidade para um ou mais dos ativos agentes antifúngicos sistemicamente padronizados.

No presente trabalho esta evidência foi constatada onde o ravuconazol teve um CIM<sub>90</sub> de 0,06 µg/ml para *C. dubliniensis* (Tabela 4) e o fluconazol teve CIM<sub>90</sub> proporcionalmente maior para *C. dubliniensis* (Tabela 3), necessitando de maior quantidade de antifúngico para inibir crescimento do fungo.

### 5.3 SUSCETIBILIDADE DE *Candida spp* FRENTE AO ALBACONAZOL

A introdução dos azólicos tem permitido tratamento de micoses invasivas e representa alternativa para anfotericina B em algumas indicações. Entretanto, vários problemas de resistência estão emergindo a estes antifúngicos, e a resistência relativa de certas espécies não-*albicans* para fluconazol. Estes problemas estimulam o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, onde o albaconazol aparece como um novo agente triazólico de amplo espectro e com excelente biodisponibilidade. Isto foi constatado por Ramos et al. (1999), onde avaliaram a atividade *in vitro* do albaconazol, quando comparado com o fluconazol e itraconazol, contra 283 isolados clínicos de *Candida spp*. Albaconazol foi mais potente contra *Candida spp*. do que ambos fluconazol e itraconazol, e igualmente contra alguns isolados de *C. albicans* e *C. krusei* com diminuição da suscetibilidade para o fluconazol (CIM 16 µg/ml).

No presente estudo, todas as cepas de *Candida spp* foram sensíveis ao albaconazol, resultados estes encontrados nos reportados por Ramos et al. (1999) onde relatam que albaconazol foi mais ativo do que fluconazol contra todas as *Candida spp* testadas.

Bartoli et al. (1997), encontraram que albaconazol foi mais ativo do que fluconazol contra todos os isolados de *Candida spp*. Em adição, o espectro de atividade foi melhor do que ao itraconazol. Entretanto, alguns isolados de *Candida spp* foram menos sensíveis que albaconazol. Eles encontraram que para isolados aos quais os CIMs do fluconazol foram altos, itraconazol e albaconazol foram proporcionalmente mais altos do que para aqueles isolados fluconazol-sensível (CIM ≤ 8 µg/ml), os quais podem indicar resistência-cruzada. Contudo, o CIM<sub>50</sub> do albaconazol para isolados de *C. albicans* e *C. krusei* fluconazol-resistente isolados foi ≤ 0,0002 µg/ml, confirmando que albaconazol tem excelente atividade

contra *C. albicans* e *C. krusei*, igualmente contra alguns isolados com diminuição de sensibilidade para fluconazol. No presente estudo tivemos semelhanças ao relatado. Quando se compara a tabela 3 com a tabela 5, visualiza-se que os CIMs do albaconazol, referentes aos isolados fluconazol-resistentes, ou seja, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, foram menores do que os outros isolados.

#### **5.4 SUSCETIBILIDADE DE *Candida spp* FRENTE A MICAFUNGINA**

A prevalência de infecções fúngicas tem aumentado significativamente nas últimas décadas. *Cândida* e *Aspergillus spp.* são os fungos mais comuns devido a recentes mudanças da tecnologia médica. A anfotericina B continua sendo o tratamento de escolha em muitos casos de micoses severas disseminadas, mas problemas com toxicidade, resistência e a não disponibilidade da forma farmacêutica de absorção oral são importantes obstáculos. Os azóis oferecem uma menor toxicidade, mas, muitas vezes, eles não são tão efetivos como a anfotericina B e a resistência é um problema que está aumentando. As equinocandinas são novos agentes antifúngicos ativos com um novo mecanismo de ação. Apesar destes agentes não serem a droga antifúngica ideal, eles oferecem novas opções de terapia (ARATHOON, 2001). No ano 2000, a caspofungina foi a primeira equinocandina a ser licenciada para uso e outros estão passando por estágios avançados de investigação, entre eles a micafungina a qual também já foi licenciada (DENNIG, 2003).

No estudo de Laverdiere et al. (2002) foram observados as atividades dos novos antifúngicos, azólicos e equinocandinas, e os

antifúngicos usuais. Analisaram o CIM<sub>50</sub> da micafungina e de outros antifúngicos novos e usuais frente a isolados de *Cândida spp* e o resultado encontrado para a micafungina foi de 0,25 µg/ml. Em nossos estudos o maior resultado do CIM<sub>50</sub> foi de 0,125 µg/ml para *C. albicans* e de 0,06 - 0,03 µg/ml para as não-*albicans*, evidenciando a potente ação da micafungina frente às cepas analisadas.

Em estudo de Maesaki et al. (2000), foi analisado a eficácia da micafungina frente a cepas de *C. albicans*, resistente aos azóis, identificadas em infecção disseminada em ratos, nas quais os CIMs achados foram menores do que do fluconazol e anfotericina B, evidenciando a potente ação deste antifúngico frente a *C. albicans* resistente aos azóis. No presente estudo as cepas de *C. albicans* testadas foram resistentes ao fluconazol e sensíveis a micafungina, confirmando os resultados encontrados por Maesaki et al. (2000).

Komatsu et al. (2003) analisaram a atividade antifúngica de agentes antifúngicos, incluindo a micafungina, contra 92 cepas de *Candida spp* isoladas de hospital. Os CIMs<sub>80</sub> dos agentes antifúngicos contra *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* foram os seguintes: micafungina de 0,03-0,125 µg/ml, fluconazol de 0,5-32 µg/ml. Os CIMs<sub>90</sub> no presente estudo foram maiores para o fluconazol onde as faixas foram de 2-16 µg/ml (Tabela 3) e para micafungina os achados foram semelhantes (Tabela 6), na faixa de 0,06-0,125 µg/ml. Komatsu et al. (2003) levantaram também as taxas dos fungos isolados resistentes às drogas, onde 20% do fluconazol foi resistente a *C. tropicalis* e 33% quando incluindo a dose-dependente (S-DD); 5% para cepas de *C. albicans* fluconazol-resistente e 11% quando incluindo a S-DD, mostrou que a micafungina teve excelente atividade antifúngica frente àquelas cepas de *Candida spp* azóis-resistentes, o que vem de encontro aos dados encontrados no presente estudo.

## 5.5 SUSCETIBILIDADE DE *Cryptococcus neoformans* FRENTE AO FLUCONAZOL

No presente estudo os testes de suscetibilidade ao fluconazol evidenciaram perfis de suscetibilidade variáveis entre 1,0 e 32 µg/ml. De acordo com os critérios de leitura, preconizados pelo NCCLS, todos os isolados foram considerados sensíveis ao fluconazol, tanto para as amostras de origem clínica como ambiental. Estes resultados estão de acordo com os achados por Goulart (2002).

Os testes de suscetibilidade a antifúngicos se revelam de importância, uma vez que, identificam cepas resistentes, permitem correlações entre estudo *in vitro* e resultados clínicos, predizendo assim a terapêutica (PFALLER et al., 1996; ALLER et al., 2000).

A função dos testes de suscetibilidade nos isolados clínicos de *C. neoformans* está diretamente relacionada com a complexidade deste triazólico na manutenção dos pacientes com SIDA e nas meningoencefalites criptococócicas traz a possibilidade do desenvolvimento de resistência a este agente (JOSEPH-HORNE et al., 1995). Segundo Kelly et al. (1994) a ocorrência de resistência em *C. neoformans*, sobretudo frente ao fluconazol são menos freqüentes, mas não menos importantes, o que é constatado no presente estudo e também confirmado por Datta et al. (2003), onde os CIMs observados reafirmam a suscetibilidade do *Cryptococcus* frente aos triazólicos.

Não pode ser descartada a possibilidade do desenvolvimento de resistência, conforme relatado por Assing, Birgens & Arendrup (2003), onde constataram casos de resistência do *C. neoformans* ao fluconazol em pacientes com SIDA. O tratamento da meningoencefalite criptococócica é altamente refratário, evidenciando taxas de relapso a

50% após o tratamento primário (JOSEPH-HORNE et al., 1995; ALVES et al., 1997). Os tratamentos incluem a anfotericina B na fase inicial seguido de fluconazol como terapêutica de manutenção, o que pode significar o uso indevido do fluconazol. Estas características terapêuticas revestem o monitoramento da suscetibilidade do *C. neoformans* com características muito especiais. Assim, cepas do primo-isolamento de pacientes com SIDA e meningite criptocócica devem ser avaliadas frente à anfotericina B porque este poliênico será a droga de ataque, e tem poder fungicida. A possibilidade dos isolados serem primariamente resistentes à anfotericina B não pode ser descartada.

Nessa ocasião, a avaliação da suscetibilidade ao fluconazol é importante para descartar resistência intrínseca e, sobretudo, se constituir no primeiro parâmetro para comparações futuras, no caso dos relapsos. Portanto, a possibilidade de resistência aos azólicos é maior após longo uso de agentes como fluconazol (ALVES et al., 1997). Apesar destas peculiaridades, casos de resistência cruzada a poliênicos e azólicos também já foram documentados (JOSEPH-HORNE et al., 1995).

Com relação ao fluconazol, não foram observadas diferenças significativas entre os isolados clínicos e ambientais, o que está de acordo com outros autores (BAVA & NEGRONI, 1989; FROMITLING et al., 1989; FRANZOT & HANDAM, 1995). É oportuno ressaltar que a grande maioria dos isolados clínicos, aqui estudada, representava primo-isolamento, justificando CIMs julgadas sensíveis.

## 5.6 SUSCETIBILIDADE DE *Cryptococcus neoformans* FRENTE AO RAVUCONAZOL

Para o tratamento da meningite criptocócica, fluconazol tem sido primariamente usado para manutenção da terapia ou profilaxia. Entretanto, cepas de fluconazol-resistentes a *C. neoformans* tem sido demonstradas por diversos investigadores (BERG et al., 1998). Itraconazol tem sido mais efetivo que fluconazol no tratamento da meningite criptocócica em pacientes infectados pelo HIV. Por estas razões, investigação das atividades de novos agentes antifúngicos contra *C. neoformans* estão sendo pesquisadas (YAMAZUMI et al., 2000).

Ravuconazol é um novo agente antifúngico triazólico com um amplo espectro e potente atividade contra a maioria dos patógenos fúngicos como *C. neoformans*. (BARTROLI et al, 1998).

Conforme estudo de Yamazumi et al. (2000), frente à suscetibilidade *in vitro* de três antifúngicos triazólicos (fluconazol, itraconazol e ravuconazol), contra isolados clínicos de *C. neoformans*, foi constatado que os isolados foram geralmente suscetíveis a todos os triazólicos, sendo que o ravuconazol foi o mais potente deles. Os CIM<sub>90</sub> para fluconazol e ravuconazol foram de 8 µg/ml e 0,25 µg/ml no estudo de Yamazumi, e os resultados do presente estudo resultaram em CIM<sub>90</sub> de 8 µg/ml e 0,125 µg/ml, respectivamente. Em ambas as situações os isolados foram sensíveis e onde o ravuconazol mostrou ser o agente mais ativo, pois 90% dos isolados são inibidos a 0,125 µg/ml e 0,06 µg/ml, inferiores aos CIMs do fluconazol e aos achados de Yamazumi.

Em estudos de Sheenan et al. (1999), frente à ação do ravuconazol, foi constatado que o CIM<sub>90</sub> foi de 0,10 µg/ml, semelhantes aos resultados encontrados no presente trabalho onde o CIM<sub>90</sub> foi de



0,125 µg/ml. Quando comparado com o itraconazol o CIM<sub>90</sub> foi quatro vezes maior que o do ravuconazol, ou seja, 0,39 µg/ml, evidenciando assim a potente ação fungicida do ravuconazol contra *C. neoformans*, nos isolados testados e com uma ação ainda maior nos de origem ambiental, onde 90% das cepas foram sensíveis a concentrações de 0,06 µg/ml de ravuconazol.

Considerando a ecologia e ubiquidade do *C. neoformans* na natureza, bem como o fato de que a inalação de partículas infecciosas a partir de excrementos de pombos seja a principal via de infecção em humanos, o estudo da suscetibilidade das cepas isoladas em nichos naturais tem despertado a atenção de diversos pesquisadores (BAVA & NEGRONI, 1989; FROMITLING et al., 1989; ALVES et al., 1997).

No presente estudo as amostras de *C. neoformans* isoladas do meio ambiente foram sensíveis aos antifúngicos azólicos testados.

## 5.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização de testes de suscetibilidade, frente a antifúngicos, requer profissional treinado, uma vez que envolve procedimentos bem mais complexos do que os antibiogramas realizados com bactérias. A técnica recomendada pelo NCCLS (M27-A) deverá ser rigorosamente seguida para que os resultados possam ser confiáveis, reprodutíveis e possam ter o impacto clínico esperado.

É possível que na presente década, face ao sucesso dos tratamentos HAART (*highly active antiretroviral therapy*), as micoses

oportunistas dos pacientes com SIDA se reduzam drasticamente. Todavia, as conseqüências destes novos agentes na microbiota humana são, ainda, pouco conhecidas. Somente a rigorosa vigilância da suscetibilidade dos fungos é recomendável, pois, desta forma, estaremos contribuindo para a menor morbidade e maior sobrevida dos pacientes.

Um número de novos e promissores agentes antifúngicos de amplo espectro está no horizonte, como os triazólicos de segunda geração e novas classes terapêuticas como as equinocandinas. São esperados que, tais drogas, apresentem boa eficácia clínica contra os agentes, atualmente conhecidos, boa tolerabilidade, segurança e perfil farmacocinético, para que sua utilização possa beneficiar a totalidade dos pacientes acometidos por complicações infecciosas.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

- 1) Os isolados dos gêneros *Candida* mostraram-se sensíveis frente à micafungina;
- 2) Todos os isolados do gênero *Candida* e cepas de *Cryptococcus neoformans* foram sensíveis ao ravuconazol, de acordo com os pontos de corte;
- 3) Todos os isolados do gênero *Candida* foram considerados sensíveis a albaconazol;
- 4) Comparando-se a suscetibilidade de *C. albicans* com *Candida* não *albicans*, não se observaram diferenças significativas frente a todos os antifúngicos estudados;
- 5) Todos os isolados de *C. neoformans* evidenciaram sensibilidade ao fluconazol e não foram observadas diferenças significativas quando se comparou a sensibilidade de acordo com a origem clínica ou ambiental;
- 6) Cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* apresentaram resistência ao fluconazol.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSEN, T.G.; WIDING, E.; GLOMSTEIN, A.; GAUSTAD, P. Disseminated fungal disease resistant to fluconazole treatment in a child with leukemia. **Scand. J. Infect. Dis.**, Stockholm, v. 24, p. 391-393, 1992.

AHEARN, D.G.; MCGLOHN, M.S. *In vitro* susceptibilities of sucrose - negative *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae*, and *Candida norvegensis* to amphotericin B, 5-fluorocytosine, miconazole and ketoconazole. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 19, n. 3, p. 412-416, 1984.

ALVES, S.H.; LOPES, J. O.; COSTA, J. et al. Development of secondary resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 39, n. 6, p. 359-361, 1997.

ALVES, S.H. et al. Perfil da suscetibilidade dos fungos leveduriformes isolados no Hospital Universitário de Santa Maria – RS. XI **Congresso Brasileiro de Infectologia**. São Paulo, 1-4 agosto, 1999.

\_\_\_\_\_. A importância de *Candida dublinensis* no diagnóstico laboratorial das micoses oportunistas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 32 (2): 65-68, 2000.

\_\_\_\_\_. Aspectos atuais da resistência aos antifúngicos azólicos e poliênicos. **Infarma**, v.15, n. 3/4, p. 75-77, 2002.

ALLER, A. I.; MARTIN-MAZUELOS, E.; LOZANO, F. et al. Correlation of fluconazol MICs clinical outcome in cryptococcal infection. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 44, p. 11544-1548, 2000.

ANDRIOLE, V.T. Current and futuro antifungal therapy: new targets for antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, n° 44, p. 151-162, 1999.

ARATHOON, E.G. Clinical efficacy of echinocandin antifungals. **Curr Opin Infect Dis.**, v. 14(6), p. 685-691, 2001.

ASSING, K.; BIRGENS, H.; ARENDRUP, M. *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* resistant to fluconazole in a HIV-negative patient with chronic lymphocytic leukemia. **Clin. Microbiol. Infect.** Copenhagen-Denmark, 9(5):441-4, may 2003.

BANERJEE, A.; GANESAN, K.; DATTA, A. Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. **J. Gen. Microbiol.**, Colchester, v. 137, p. 2455-2461, 1991.

BARCHIESI, F.; COLOMBO, A.L.; McGOUCH, D.A. et al. *In vitro* activity of intraconazole against fluconazole - susceptible and - resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients infected with Human Immunodeficiency Virus. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 38, n. 7, p. 1530-1533, 1994.

BARTROLI, J.; TURMO, E.; ALGUERÓ, M. et al. A new triazole derivative with potent broad-spectrum antifungal activity. In: **Abstracts of the Thirty-Seventh Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Toronto. Canadá, 1997. Abstract E-67, p.125. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1997.

BARTROLI, J. et al. New azole antifungals. 3. Synthesis and antifungal activity of 3-substituted-4(3H)-quinazolinones. **J. Med. Chem.**, 41:1869-1882, 1998.

BAVA, A.; NEGRONI, R. Suscetibilidad *in vitro* de cepas de *Cryptococcus* a 5 drogas antifúngicas. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 31, p. 346-350, 1989.

BERG, J.; CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H. The hidden danger of primary fluconazole prophylaxis for patients with AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, 26:186-187, 1998.

BERROUANE, Y.F.; HERWALDT, L.A.; PFALLER, M.A. Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in na university hospital. **J. Clin. Microbiol.**, 37(3):531-537, 1999.

BLUMBERG, H.M.; HENDERSHOT, E.F.; LOTT, T.J. Persistent of the same *Candida albicans* strain despite fluconazole therapy. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 15, p. 545-547, 1992.

BODENHOFF, J. Development of strains of *Cryptococcus neoformans* resistant to nystatin, amphotericin B, trichomycin and polymixin B. **Acta Path. Microb. Scand.**, v. 73, p. 572-582, 1968.

BODEY, G.P. Azole antifungal agents. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 14, n. 1 suppl., p. 161-169, 1992.

\_\_\_\_\_. **Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment.** 2 ed. New York: Raven Press, 1993.

BOKEN, D.J.; SWINDELLS, S.; RINALDI, M.G. Fluconazole - resistant *Candida albicans*. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 17, p. 1018-1021, 1993.

BORG, M.; RUCHEL, R. Expression extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida spp* during experimental infection of oral mucosa. **Infect. Immun.**, New Hampshire, v. 56, n. 3, p. 626-631, 1988.

BOTTONE, E. J. et al. Serogrup distribution of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. **J. Infect. Dis.**, v. 156, p. 242, 1987.

CABRÉ, L.; SERRANO, J.; VIVES, A.; CIRERA, J. Pustulosis por *Candida albicans* resistente al cetoconazol en una paciente heroinómana. **Med. Clin.**, Barcelona, v. 84, n. 13, p. 542, 1985.

CAPILLA, J. et al. *In vitro* antifungal activities of the new triazole UR-9825 against clinically important filamentous fungi. **Antimicrob. Agents Chemother**, 45: 2635-2637, 2001.

\_\_\_\_\_. Efficacy of Albaconazole (UR-9825) in treatment of Disseminated *Scedosporium prolificans* infection in Rabbits. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 47, p. 1948-1951, june 2003.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. American Society for Microbiology. Washington, 1998.

CHACKRABARTI, A.; NAYAK, N.; TALWAR, P. *In vitro* proteinase production by *Candida* species. **Mycopathologia**, The Hague v. 114, p. 163-168, 1991.

CHANDRESEKAR, P.H.; GATNY, C.M. Bone Marrow Transplantation Team: the effect of fluconazole prophylaxis on fungal colonization in neutropenic cancer patients. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 33, p. 309-318, 1994.

CHEN, S.C.A.; MULLER, M.; ZHOU, J.C. et al. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? **J Infect. Dis.**, v. 175, p. 414-420, 1997.

CHERNIAK, R.L.; MORRIS, L.C.; MEYER, S.A. et al. Glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* obtained from patients with AIDS. **Carbohydr. Rev.**, v.449, p. 405-413, 1993.

CHERNIAK, R.L.; SUNDSTROM, J.B. Polissacaride antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immunol.**, v. 62, p. 1507-1512, 1994.

COLLIN, B. et al. Antifungal resistance in non-*albicans candida* species. **Drug Resistance Updates**. Harcourt Brace, cap. 2, p., 9-14, 1999.

COLOMBO, A. Aspectos atuais da terapia antifúngica. **Avanços recentes na terapêutica antiinfeciosa**. Merck Sharp & Dohme. n° 65. p. 15-21. São Paulo: Office, 2003.

COLOMBO, A.L.; BARCHIESI, F.; McGOUGH, D.A.; RINALDI, M.G. Comparison of E test and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, n. 3, p. 535-540, 1995.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; SALOMAO, R. et al. High rate of non-*albicans candidemia* in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, n. 4, p. 281-286, 1999.

COLOMBO, A.L.; NAKAGAWA, Z.; VALDETARO, F. et al. Suscetibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida spp.* collected from Brazilian tertiary care hospitals. **Med. Mycol.**, Brazil, v. 41, n. 3, p. 235-239, 2003.

DATTA, K. et al. Fluconazole and intraconazole suscetibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* at a tertiary care centre in India: a need for care. **Antimicrob. Chemother.** Índia, 52 (4): 683-6, sep. 2003.

DE GREGORIO, M.W., LEE, W.M.F., RIES, C.A. *Candida* infections in patients with acute leukemia: ineffectiveness of nystatin prophylaxis and relationship between oropharyngeal and systemic candidiasis. **Cancer**, Amsterdam, v. 50, p. 2780-2784, 1982.

DE NOLLIN, S., VAN BELLE, H., GOOSSENS, F., THONE, F., BORGERS, M. Cytochemical and biochemical studies of yeasts after in vitro exposure to miconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 11, n. 3, p. 500-513, 1977.

DENNING, D. W., Echinocandin antifungal drugs. **Lancet**, v. 362 (9390), p. 1142-1151, 2003.

DIEKEMA, D.J. et al. *In vitro* activities of BMS-207147 against over 600 contemporary clinical blood stream isolates of *Candida* species from the SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America. **Antimicrob. Agents Chemother**, 43: 2236-2239, 1999.

\_\_\_\_\_. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **J. Clin. Microbiol.**, Iowa, 40 (4): 1298-302, apr. 2002.

DIGNANI, M.C et al. **Medical Mycology**, Filadélfia, 2003.

DORIA FILHO, U. **Introdução à bioestatística para simples mortais**. São Paulo: Negócio, 1999.

DROUHET, E.; DUPONT, B. Evolution of antifungal agents: past, present and future. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v. 9, n. 1 suppl., p. 4-14, 1987.

DUPONT, B.; CREWE BROWN, H.H.; WESTERMANN, K. et al. Mycoses in AIDS. **Medical Mycology**, v. 38 (suppl. 1), p. 259-267, 2000.

EHRENSING, E.R.; SAAG, M. S. Criptococose. In: SAROSI, G.A.; DAVIES, S.F. **Doenças Fúngicas de Pulmão**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, 1642-1644, 1990.

ESPINEL-INGROFF, A. Clinical relevance of antifungal resistance. **Infect. Dis. Clin. North Amer.**, v.11, n.4, 1997.

FAINSTEIN, V.; BODEY, G.P.; ELTING, L. et al. Amphotericin B or ketoconazole therapy of fungal infections in neutropenic cancer patients. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 31, n. 1, p. 11-15, 1987.

FAN-HAVARD, P., CAPANO, D., SMITH, S.M. et al. Development of resistance in *Candida* isolates from patients receiving prolonged antifungal therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 35, n. 11, p. 2302-2305, 1991.

FAUS, I. **Albaconazole Oral Antifungal**. Disponível em: <<http://www.container.pharmalicensing.com/licensing/displicopp/1958>>. Acesso em: 17 jun. 2003.



FERNANDEZ, E.M.; LÓPEZ-CORTÉS, L.F.; REGORDAN, C. et al. Meningitis por *Cryptococcus neoformans* en pacientes com infecção por el HIV. **Neurología**, v. 14, p. 40-47, 1999.

FRANZOT, S.P.; HAMDAN, J. Effects of three azole derivatives on the lipids of different strains of *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**, v. 38, p. 183-189, 1995.

FRANZOT, S.P.; SALKIN., CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 838-840, 1999.

FRATTARELLI, D.A.; REED, M.D.; GIACOIA, G.P.; ARANDA, J.V. Antifungals in systemic neonatal candidiasis. **Drugs**. Detroit, USA, v. 64 (9), p. 949-968, 2004.

FROMTLING, R.A. et al. Virulence and antifungal susceptibility of environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Puerto Rico. **Mycopathologia**, v. 106, p. 163-166, 1989.

FUNG-TOMC, J.C. et al. *In vitro* activity of a new oral triazole, BMS-207147 (ER-30346). **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 42, p. 313-318, 1998

GALGANI, J.N., RINALDI, M.G., POLAK, A.M., PFALLER, M.A. Standardization of antifungal susceptibility testing. **J. Med. Vet. Mycol.**, Harlowe, v. 30, n. 1 suppl., p. 213-224, 1992.

GARAU, M. et al. *In vitro* susceptibilities of *Malassezia* species to a new triazole albaconazole (UR-9825), and other antifungal compounds. **Antimicrob. Agents Chemother**, Madrid, 47(7):2342-4, Jul. 2003.

GARCIA-HERMOSO, D.; MATHOULIN-PÉLISSIER, S.; COUPRIE, B. et al. DNA typing suggest pigeon droppings as a source of pathogenic *Cryptococcus neoformans* serotype D. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2683-2685, 1997.

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**, v. 12, n. 4, p. 501-517, Oct. 1999.

GOULART, L.S. **Aspectos da suscetibilidade e classificação molecular de *Cryptococcus neoformans***. Santa Maria: UFSM, 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 2002.

GRANIER, F. Antifungal treatments. **Presse Med.**, French, v. 31, n. 38, p. 1785-1791, 2002.

GRAYBILL, J.R. The future of antifungal therapy. **Clin Infect Dis**, v. 22, n. suppl. 2, p. 166-178, 1996.

GRISEO, G.; GALLO, M. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental and clinical sources in extreme southern Italy (Calabria and Sicily, central Mediterranean area). **Mycoses**, v. 40, p. 90-95, 1997.

GROLL, A.H. et al. Clinical Pharmacology of Systemic Antifungal Agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and Putative targets for antifungal drug development. **Advances in Pharmacology**, v. 44, p. 343-500, 1998.

GUPTA, A.K.; TOMAS, E. New Antifungal Agents. **Dermatol. Clin.**, Toronto, v. 21, n. 3, p. 565-76, 2003.

HATA, K.J. et al. *In vitro* and in vivo activities of ER-30346, a novel oral triazole with a broad antifungal spectrum. **Antimicrob. Agents Chemother**, Washington, v. 40, p. 2237-2242, 1996a.

\_\_\_\_\_. Efficacy of ER-30346, a novel oral triazole antifungal agent, in experimental models of aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. **Antimicrob. Agents Chemother**, Washington, v. 40, p. 2243-2247, 1996b.

HITCHCOCK, C.A. Cytochrome-P-450 dependent 14- $\alpha$ -sterol demethylase of *Candida albicans* and its interactions with azole antifungals. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v. 19, n. 3, p. 782-787, 1991.

HITCHCOCK, C.A.; BARRET-BEE, K.J.; RUSSEL, N.J. The lipid composition of azole-sensitive and azole-resistant strains of *Candida albicans*. **J. Gen. Microbiol.**, Colchester, v. 132, n. 9, p. 2421-2431, 1986.

HITCHCOCK, C.A.; PYE, G.W.; TROKE, P.F. et al. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 37, n. 9, p. 1962-1965, 1993.

HOLT, R.J., AZMI, A. Miconazole resistant *Candida*. **Lancet**, London, v. 1, n. 8054, p. 50-51, 1978.

HORSBURGH, C.R., KIRKPATRICK, C.H. Long-term therapy of chronic mucocutaneous candidiasis with ketoconazole: experience with twenty-one patients. **Am. J. Med.**, New York, v. 74, n. 18 suppl., p. 23-29, 1983.

INWIDTHAYA, P.; DITHAPRASOP, P.; EGLASAENG, C. Clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Bangkok (Thailand). **Mycopathologia**, v. 108, p. 64-67, 1989.

ISENBERG, H.D. Clinical Microbiology Procedures Handbook. **American Society for Microbiology**, Washington, 1992.

JABRA-RIZK, M.A. et al. Coaggregation of *Candida dublinensis* with *Fusobacterium nucleatum*. **J. Clin. Microbiol.**, 37(5):1464-1468, 1999.

JACOBSON, E.S.; TINNELL, S.B. Antioxidante function of fungal melanin. **J. Bacteriol**, v. 175, p. 7102-7104, 1993.

JARVIS, B.; FIGGITT, D.P.; SCOTT, L. J. Micafungin. **Drugs**. Nova Zelândia, v. 64(9), p. 969-982; discussão 983-984, 2004.

JAWETZ, Ernest. **Microbiologia Médica**. 14 ed. México: Editora M/M, 1992.

JOHNSON, E.M.; WARNOCK, D.W. Azole drug resistance in yeasts. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 36, p. 751-755, 1995.

JOHNSON, E.M.; WARNOCK, D.W.; LUCKER, J. et al. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 35, p. 103-114, 1995.

JORDAN, W.M.; BODEY, G.P.; RODRIGUEZ, V. et al. Miconazole therapy for treatment of fungal infections in cancer patients. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 16, n. 6, p. 792-797, 1979.

JOSEPH-HORNE, T.; HOLLOMON, D.; LOEFFLER, T.S.R. et al. Cross-resistance to polyene and azole drugs in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents. Chemother**, v. 39, p. 1526-1529, 1995.

KELLY, S.L., ROWE, J., WATSON, P.F. Molecular genetic studies on the mode of action of azole antifungal agents. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v. 19, n. 3, p. 796-798, 1991.

KELLY, S.L.; LAMB, D.C.; TAYLOR, M. et al. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol  $\sigma^{8\Pi7}$  isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strains from an AIDS patient. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 122, p. 39-42, 1994.

KERRIDGE, D.; NICHOLAS, R.O.; WAYMAN, F.J. Resistance to clinically important antimycotic drugs in *Candida spp.* **Ann. Ist. Super. Sanità**, Romme, v. 23, n. 4, p. 827-834, 1987.

KIRKPATRICK, W.R.; RENAVAL, S.G.; McATEE, R.X. et al. Deteccion of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patient in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 3007-3010, 1998.

KOMATSU, M.; AIHARA, M.; SHIMAKAWA, K. et al. *In vitro* activity of a new semisynthetic echinocandin, micafungin, against clinical isolates of *Candida* species isolated in Tenri Hospital. **Jpn. J. antibiot.** Japan, Vol. 56(6), p. 705-711, 2003

KOWALSKI, S.F., DIXON, D.M. Fluconazole: a new antifungal agent. **Clinical Pharmacy**, Washington, v. 10, p. 179-194, 1991.

KOZEL, T.R. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 8, p. 295-299, 1995.

KRCMÉRY, V.; KOZA, I.; FUCHSBERGER, P. et al. Candidosis, aspergillosis and zygomycosis in an oncology department. **Mycoses**, Berlin, v. 35, p. 189-191, 1992.

KUNOVÁ, A.; TRUPL, J.; SPÁNIK, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida krusei*, non-*albicans Candida spp.*, and other fungal organisms in a sixty-bed national cancer center in 1989-1993: no association with use of fluconazole. **Chemotherapy**, Basel, v. 41, p. 39-44, 1995.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Cryptococcosis: p. 397-446. In: **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea & Febieger, 1992.

KWON-CHUNG, K. J. Phylogenetic spectrum of fungi that are pathogenic to humans. **Clin Infect Dis**. 19: 51-57, 1994.

LAVERDIERE, M.; HOBAN, D.; RESTIERI, C.; HABEL, F. *In vitro* activity of tree new triazoles and one echinocandin against *Candida* bloodstream isolates from cancer patients. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 50, n. 1, p. 119-123, 2002.

LE GUENEC, R.; REYNES, J.; MALLIÉ, M. et al. Fluconazole - and Itraconazole - resistant *Candida albicans* strains from AIDS patients: multilocus enzyme electrophoresis and antifungal susceptibilities. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, n. 10, p. 2732-2737, 1995.

MAERTENS, J.A. History of the development of azoles derivatives. **Clin. Microbiol. Infect.**, Belgium, v. 10, n° 1, p. 1-10, 2004.

MAESAKI, S.; HOSSAIN, M.A., MIYAZAKI, Y. et al. Efficacy of FK463, a (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitor, in disseminated azole-resistant *Candida albicans* infection in mice. **Antimicrob. Agents Chemother.** Vol. 44(6), p. 1728-1730, 2000.

MANDELL, G. **Enfermedades infecciosas**: principios y práctica. 2 ed. Argentina: Panamericana, 1991.

MEIS, J.F. et al. *Candida dublinensis* candidemia in patient with chemotherapy-induced neutropenia and bone-marrow transplantation. **Emergent Infect. Dis.**, 5:150-153, 1999.

MENDES-GIANNINI, M.J.; MELHEM, M.S.C. Infecções Fúngicas. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

MIKAMO, H.; SATO, Y.; TAMAYA, T. *In vitro* antifungal activity of FK 463, a new water-soluble echinocandin-like lipopeptide. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 485-487, 2000.

MILÁN, E.P.; LAET SANT'ANNA, P.; MELO, A.S.A.; et al. Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 41, p. 29-35, 1999.

MILLER, J.L. et al. *In vitro* and *in vivo* efficacies of the new triazole albaconazole against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, USA, v. 48, n. 2, p. 384-387, 2004.

MITCHELL, T.G.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, n. 4, p. 515-548, 1995.

MORAN, G.P. et al. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dublinensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV) infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives *in vitro*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 41(3): 617-623, 1997.

MUÑOZ, A.J.C.; BRIÓ, S.; QUINDÓS, G. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. **Revista Iberoamericana de Micología**, 18: 2-5, 2001

MURPHY, J.W.; FRIEDMAN, H.; BENDINELLI, M. Fungal infections and immune responses. New York: Plenum Press, 1993.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**: approved standard M27-A. Document M27-A, 1997; 17:1-29.

NEGRONI, R.; ARECHAVELA, A.I. Itraconazole: pharmacokinetics and indications. **Arch. Med. Res.**, Mexico, v. 24, n. 4, p. 387-393, 1993.

NEUFELD, Paulo Murillo. Novos Agentes antifúngicos: foco em voriconazol e caspofungina. **SBAC** (Sociedade Brasileira de Análises Clínicas) **Jornal**. Rio de Janeiro, n. 16, fev. 2003.

NGUYEN, M. et al. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. **Am. J. Med**, v. 100, p. 617-623, 1996.

NIEHAUS, G.V.; FLYNN, T. Regulation of mannitol biosynthesis and degradation by *Cryptococcus neoformans*. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 651-655, 1994.

NUCCI, Márcio et al. Infecções por *Candida* SP no ambiente hospitalar. **Programa de Educação Médica**. Sociedade Brasileira de Infectologia. Rio de Janeiro: Janssen-Cilag, jun/1999.

NUCCI, Márcio. Estudos comparativos para o tratamento da candidíase. **Avanços Recentes na Terapêutica Antiinfecçiosa**, n. 65, p. 22-27. São Paulo: Merck Sharp & Dohme, 2003.

ODDS, F.C. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 31, p. 463-471, 1993.

ODDS, F.C.; BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 1923-1929, 1994.

ODDS, F.C.; NUFFEL, L.C.; DAMS, G. Prevalence of *Candida dublinensis* isolates in a yeast stock collection. **J. Clin. Microbiol**, 14: 124-129, 1998.

OLLERT, M.W.; WENDE, C.; GÖRLICH, M. et al. Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor in isolates from Human Immunodeficiency Virus-positive patients. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 30, n. 10, p. 2543-2549, 1995.

PARKINSON, T., FALCONER, D.J., HITCHCOCK, C.A. Fluconazole resistance due to energy - dependent drug efflux in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 39, n. 8, p. 1696-1699, 1995.

PFALLER, M.A., MESSER, S.A., COFFMANN, S. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole DO870. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, n. 5, p. 1094-1097, 1995.

PFALLER, M.A.; REX, J. H.; RINALDI, M. G. Antifungal susceptibility testing: technical advances and potential clinical applications. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 776-784, 1996.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; GREE, S.. *In vitro* susceptibilities of *Candida dublinensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. **J. Clin. Microbiol.**, 37(3):870-872, 1999.

PFALLER, M.A. *et al.* *In vitro* activities of ravuconazole and voriconazole compares with those of four approved systemic antifungal agents against 6,970 clinical isolates of *candida spp.* **Antimicrob. Agents Chemother.**, Iowa, 46(6): 1723-7, jun. 2002.

PFALLER, M.A; DIEKEMA, D.I.; MESSER, S.A. *In vitro* susceptibilities of rare *Candida* bloodstream isolates to ravuconazole and three comparative antifungal agents. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, Iowa, 48(2): 101-5, feb. 2004.

PFALLER, M.A.; MESSER S.A.; BOYDEN, L. *et al.* Cross-Resistance between Fluconazole and Ravuconazole and the Use of Fluconazole as a Surrogate Market To Predict Suscetibility and Resistance to Ravuconazol among 12.796 Clinical Isolates of *Candida spp.* **J. Clinical Microbiol.**, 42(7): 3137-3141, Iowa City, 2004.

PINJON, E. *et al.* Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dublinensis* fom *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, 36(7): 2093-2095, 1998.

POWDERLY, W. G.; KEATH, E. J.; SOKOL-ANFERSON, M. *et al.* Amphotericin B-resistant *Cryptococcus neoformans* in a patient with AIDS. **Infect. Dis. Clin. Pract.**, v.1, p. 314-316, 1990.

QUINDÓS, G.; ALONSO-VARGAS; RUESGA, M.T. *et al.* *Candida dubliniensis* susceptibility to current and new antifungal agents. **Trends in Invasive Fungal Infections**, Malta, v. 5, p. 2-10, 1999.

QUINDÓS, G. Las micosis en el amanecer del siglo XXI. **Rev. Iberoamericana de Micología**, n. 19, p. 1-4, 2002.

RAMOS, G. et al. *In vitro* comparative activity of UR-9825, intraconazole and fluconazole against clinical isolates of *Candida spp.* **J. Antimicrob. Chemother**, Madrid, 44(2):283-6, Aug. 1999.

REX, J.H.; PFALLER, M.A.; RINALDI, M.G. et al. Antifungal susceptibility testing. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 6, n. 4, p. 367-381, 1993.

REX, J.H.; RINALDI, M.G.; PFALLER, M.A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 39, n. 1, p. 1-8, 1995.

RICO, M.J.; PANNEYS, N.S. Cutaneous cryptococcosis resembling molluscum contagiosum in a patient with AIDS. **Arch. Dermatol.**, v.121, p. 901, 1985.

RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. **Fungal Infections: diagnosis and management.** USA: Blackwell Scientific, 1993.

ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A.J.R.; WANKE, B. et al. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a Brazilian AIDS patient. **Mycopatologia**, v. 112, p. 33-34, 1990.

SANGLARD, D. et al. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, n. 11, p. 2378-2386, 1995.

SCHOLER, H.J., POLAK, A. Resistance to systemic antifungal agents. In: BRYAN, L.E., ed. **Antimicrobial drug resistance.** Orlando: Academic Press, p. 393-460, 1984.

SHADOMY, S., PFALLER, M. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and quantitation in body fluids. In: BALLOWS, A.; HAUSLER JR, W.J.; HERRMANN, K.L. et al. **Manual of clinical microbiology.** 5. ed. Washington: American Society of Microbiology, 1991. p. 1173-1183.

SHEEHAN, D.J., HITCHCOCK, C.; SIBLEY, C.M. Current and Emerging Azole Antifungal Agents. **Clinical Microbiology Reviews.**, p. 40-79, jan. 1999.



SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

SUGAR, A.M., ANAISSIE, E.J., GRAYBILL, J.R., PATTERSON, T.F. Fluconazole. **J. Med. Vet. Mycol.**, Harlowe, supl. 1, p. 201-212, 1992.

SUGAR, A.M., LIU, X. Comparison of three methods of antifungal susceptibility testing with the proposed NCCLS standard broth macrodilution assay: lack of effect of phenol red. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 21, p. 129-133, 1995.

SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dublinensis*: characteristics and identification. **J. Clin. Microbiol.**, 36(2):329-334, 1998.

SULLIVAN, D.J. et al. *Candida dublinensis* sp nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology**, 141:1507-1521, 1995.

SULLIVAN, D.J. et al. Widespread geographic distribution of oral *Candida dublinensis* strain in human immunodeficiency virus-infected individuals. **J. Clin. Microbiol.**, 35: 960-964, 1997.

SULLIVAN, D.J. et al. *Candida dublinensis*: an update. **Rev. Iberoam. Micol.**, 16:72-76, 1999.

SURARIT, R., SHEPERD, M.G. The effects of azole and polyene antifungals on the plasma membrane enzymes of *C. albicans*. **J. Med. Vet. Mycol.**, Harlowe, v. 403-413, 1987.

SWERDLOFF, J.N., FILLER, S.G., EDWARDS, J.E. Severe candidal infections in neutropenic patients. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 17/supl., p. 457-467, 1993.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

TAVITIAN, A.; RAUFMAN, J.P.; ROSENTHAL, L.E. et al. Ketoconazole - resistant *Candida* esophagitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Gastroenterology**, New York, v. 90, p. 443-445, 1986.

TAWARA, S. et al. *In vitro* activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK 463, against a variety of clinically important Fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 57-62, jan. 2002.

THOMAS, A.H. Suggested mechanisms for the antimycotic activity for the polyene antibiotics and the N-substituted imidazoles. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 17, n. 3, p. 269-279, 1986.

TIBALLI, R.N.; ZARINS, L.T.; HE, X.; KAUFFMAN, C.A. *Torulopsis glabrata*: azole susceptibilities by microdilution colorimetric and macrodilution broth assays. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, n. 10, p. 2612-2615, 1995a.

TIBALLI, R.N.; HE, X.; ZARINS, L.T. et al. Use of a colorimetric system for yeast susceptibility testing. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, n. 4, p. 915-917, 1995b.

VAN DER HORST, C.M.; SAAG, M.D.; CLOUD, G.A. et al. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 15-21, 1997.

VANDEN BOSSCHE, H.; WILLEMSSENS, G.; MARICHAL, P. Anti-*Candida* drugs - the biochemical basis for their activity. **CRC Crit. Rev. Microbiol.**, Cleveland, v. 241, n. 1, p. 57-72, 1987.

VANDEN BOSSCHE, H. et al. Mutation in cytochrome P-450 dependent 14  $\alpha$ -dimethylase results in decreased affinity for azole antifungals. **Biochemical Society Transactions**, 18:56-59, 1990.

VANDEN BOSSCHE, H.; MARICHAL, P.; ODDS, F.C. et al, Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 36, n. 12, p. 2602-2610, 1992.

VANDEN BOSSCHE; H. MARICHAL, P.; LE JEUNE, L. et al. Effects of itraconazole on cytochrome P-450-dependent sterol 14- $\alpha$ -demethylation and reductin of 3-ketosteroids in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 37, p. 2101-2105, 1993.

VANDEN BOSSCHE, H.; MARICHAL, P.; ODDS, F.C. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v. 2., n. 10, p. 393-400, 1994.

VANDEN BOSSCHE, H.; WARNOCK, D.W.; DUPONT, B. et al. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. **J. Med. Vet. Mycol.**, Harlowe, v. 32, suppl. 1, p. 189-202, 1994.

VENKATESWARLU, K.; TAYLOR, M.; MANNING, N.J. et al. Fluconazole tolerance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 41, p. 748-751, 1997.

VERONESI, R. **Tratado de Infectologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

WALSH, T.J. et al. New targets and delivery systems for antifungal therapy. **Medical Mycology.**, v. 38 supplement I, p. 335-347, 2000.

WALSH, T.J.; LEE, J.W. Prevention of invasive fungal infections in patients with neoplastic diseases. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 17, suppl. 2, p. 5468-5480, 1993.

WANG, Y.; CASADEVAL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to the fungicidal effects of ultraviolet light. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 3864-3866, 1994a.

\_\_\_\_\_. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of 1-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 38, p. 2648-2650, 1994b.

WARNOCK, D.W.; JOHNSON, E.M.; RICHARDSON, M.D.; VICHERS, C.F.H. Modified response to ketoconazole of *C. albicans* from a treatment failure. **Lancet**, London, v. I, n. 8325, p. 642-643, 1983.

WARNOCK, D.W.; BURKE, J.; COPE, N.J. et al. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. **Lancet**, London, v. II, n. 8623, p. 1310, 1988.

WARREN, N.G.; HAZEN, K.C. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In: MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, American Society for Microbiology, p. 1184-1199, 1999.

WATSON, P.F.; ROSE, E. M.; ELLIS, S.W. et al. Defective sterol C5-6 desaturation and azole resistance: a new hypothesis for the mode of action of azole antifungals. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 164, p. 1170-1175, 1989.

WHITE, D.J.; JOHNSON, E.M.; WARNOCK, D.W. Management of persistent vulvovaginal candidosis due to azole - resistant *Candida glabrata*. **Genitourin. Med.**, London, v. 69, p. 112-114, 1993.

WHITE, A.; GOETZ, M.B. Azole - resistant *Candida albicans*: report of two cases of resistance to fluconazole and review. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 19, p. 687-692, 1994.

WHITE, T.C. et al. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance . **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 382-402, 1998.

WINGARD, J.R.; VAUGHAN, W.P.; BRAINE, H.G. et al. Prevention of fungal sepsis in patients with prolonged neutropenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intravenous miconazole. **Am. J. Med.**, New York, v. 83, p. 1103-1110, 1987.

WINGARD, J.R.; MERZ, W.G.; RINALDI, M.G. et al. Increase in *Candida Krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 31, p. 1274-1277, 1991.

WINGARD, J.R. Infections due to resistant *Candida* species in patients with cancer who are receiving chemotherapy. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 19, suppl. 1, p. 49-53, 1994.

\_\_\_\_\_. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in Oncology patients. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 20, p. 115-125, 1995.

WORKING PARTY OF THE BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY. Antifungal drug susceptibility. **J. Clin. Chemother.**, London, v. 36, p. 899-909, 1995.

YAMAMOTO, Y.; KOHNO, S.; KOGA, H. et al. Random amplified polymorphic DNA analysis of clinical and environmental isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. **J. Clin. Microbiol**, v. 34, p. 2290-2291, 1996.

YAMAZUMI, T. et al. *In Vitro* of Ravuconazole (BMS-207147) against 541 Clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother**, Washington, v. 44, n. 10, p. 2883-2886, October 2000.