

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

**AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE *Candida glabrata* RESISTENTES AO FLUCONAZOL FRENTE A
COMBINAÇÕES DE ANTIFÚNGICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Izabel Almeida Alves

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE *Candida glabrata*
RESISTENTES AO FLUCONAZOL FRENTE A
COMBINAÇÕES DE ANTIFÚNGICOS**

por

Izabel Almeida Alves

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

Orientador: Sydney Hartz Alves

Santa Maria, RS, Brasil

2011

© 2011

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

Endereço eletrônico: izabelalmeida@hotmail.com

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

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

**AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE *Candida glabrata*
RESISTENTES AO FLUCONAZOL FRENTE A
COMBINAÇÕES DE ANTIFÚNGICOS**

elaborada por
Izabel Almeida Alves

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

Comissão Examinadora:

Sydney Hartz Alves, Dr.
(Presidente/Orientador)

Irina Lübeck, Dr^a (UNIPAMPA)

Sônia Botton, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 25 de março de 2011.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais, Maria Izabel e Cezário, pelo amor, carinho, paciência, e por simplesmente estarem ao meu lado nas escolhas mais importantes da minha vida. Serei eternamente grata a vocês.

Ao meu orientador, Prof. Sydney Hartz Alves, pela confiança em meu trabalho. Agradeço pela amizade e carinho demonstrados, pelos ensinamentos e oportunidades que me foram oferecidas. Muito Obrigada.

À todos os colegas de LAPEMI, pelos momentos de apoio, amizade e descontração, que certamente contribuíram para a realização deste trabalho. Certamente sentirei saudades da convivência com os amigos que lá encontrei. Em especial, agradeço às minhas companheiras de 4106, Débora, Luana, Tarcieli, Caroline, Laura e minha querida estagiária Laíssa, pela troca de conhecimentos, amizade e companherismo.

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

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

À minha eterna professora Letícia Goulartt, a quem tenho grande admiração, agradeço pelos ensinamentos, amizade, oportunidades e incentivo a vida acadêmica.

Ao meu namorado, André, por todo seu amor, força, compreensão e respeito por minha dedicação a este trabalho. Agradeço por não me deixar desanimar nos momentos mais difíceis, por acreditar na minha capacidade, e por me incentivar a continuar sempre.

Às minhas queridas amigas, Maureline, Elisandra, Patrícia e Fernanda pelo companheirismo, amizade e carinho constantes, nos momentos difíceis. Muito obrigada!

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida. E entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos e as que desistem deles.”

Augusto Cury

RESUMO

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

AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE *Candida glabrata* RESISTENTES AO FLUCONAZOL FRENTE A COMBINAÇÕES DE ANTIFÚNGICOS

Autora: Izabel Almeida Alves

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 25 de março de 2011.

A frequência de micoses invasivas devido a fungos oportunistas tem evidenciado significativo aumento nas duas últimas décadas. O uso prolongado e indiscriminado dos azólicos evidenciou o desenvolvimento de resistência a estes fármacos nas espécies de *Candida*. A espécie *C. glabrata* caracteriza-se por elevados percentuais de resistência primária ao fluconazol fato que determina dificuldades terapêuticas adicionais.

No presente estudo, dois grupos de isolados de *C. glabrata* foram avaliados: o primeiro formado por isolados clínicos sensíveis ao fluconazol, e o segundo, derivado do primeiro, foi formado pelos mesmos isolados, após terem sido induzidos a resistência ao fluconazol *in vitro*. Mesmo neste grupo de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol, os testes de suscetibilidade já evidenciaram resistência frente a outros azólicos como ao itraconazol e voriconazol.

Os derivados resistentes ao fluconazol evidenciaram concentrações inibitórias mínimas maiores ou iguais a 64 µg/mL. Neste grupo de isolados fluconazol-resistentes, os testes de suscetibilidade detectaram resistência cruzada com cetoconazol, voriconazol e itraconazol bem como com outros agentes de outras classes como a anfotericina B e caspofungina.

A indução da resistência foi realizada com o objetivo de se comparar a suscetibilidade entre os dois grupos, frente a fármacos combinados.

As associações de antifúngicos entre os grupos sensíveis e resistentes ao fluconazol resultaram, em maior parte, interações indiferentes. No entanto as associações mostraram-se mais eficazes nos isolados resistentes ao fluconazol. Em ambos os grupos, a combinação que resultou em maior sinergismo foi anfotericina B com flucitosina (G1 = 61,77%. e G2 = 76,47%); outras combinações sinérgicas foram anfotericina B + cetoconazol (G2 = 73,53%), anfotericina B + voriconazol (G2 = 55,88%), todos com ausência de antagonismo. Os maiores percentuais de antagonismo foram observados na combinação cetoconazol + flucitosina (G1 = 61,77% e G2 = 55,88%).

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

ABSTRACT

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

AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE *Candida glabrata* RESISTENTES AO FLUCONAZOL FRENTE A COMBINAÇÕES DE ANTIFÚNGICOS

Autora: Izabel Almeida Alves

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 25 de março de 2011.

In the last decades the invasive mycoses caused by opportunistic fungi has showed a significant growth. The extensive use of azoles showed that the development of resistance of *Candida* species to these drugs is an emergent phenomenon. *C. glabrata* typically presents high degree of primary resistance to fluconazole what determine additional difficulties in the therapies.

Here two groups of *C. glabrata* isolates were evaluated: the first formed by strains primarily fluconazole-susceptible and the second generated by the first, was composed by the same isolates after induction of the fluconazole-resistance. The susceptibility tests detected even in the first group, strains azole-resistant as against itraconazole and voriconazole. The induction of resistance to fluconazole was carried out in order to compare the susceptibilities between the two groups against combined drugs.

The fluconazole-resistant strains (Group 2) showed MIC \geq 64 μ g/ml and cross-resistance was either detected with fluconazole, voriconazole and itraconazole as well as to other antifungal agents as amphotericin B and caspofungine.

The more frequent interaction observed was indifference, however important synergisms were showed against fluconazole-resistant isolates. The best synergism was registered with amphotericin B+ flucytosine (G1 = 61,77% and G2=76,47%). Other synergistic interactions were amphotericin B+ketoconazole (G2=73,53%), amphotericin B+voriconazole (G2=55,88%), amphotericin B+voricoonazole (G2=55,88%), all of them without antagonisms. The highest percentage of the antagonism were observed with ketoconazole+flucytosine (G1=61,77% and G2= 55,88%).

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

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados de *C. glabrata* frente ao fluconazol antes (GS) e após (GR) a exposição ao fluconazol..... 42
- Tabela 2: Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) *in vitro* dos isolados de *C. glabrata* aos agentes antifúngicos antes (GS) e depois (GR) de crescente exposição ao fluconazol..... 43
- Tabela 3: Interações das combinações de anfotericina B com antifúngicos frente a *C. glabrata* sensíveis (GS) e resistentes (GR) ao fluconazol..... 48
- Tabela 4: Interações das combinações de flucitosina com antifúngicos frente a *C. glabrata* sensíveis (GS) e resistentes (GR) ao fluconazol..... 50
- Tabela 5: Interações das combinações de voriconazol com antifúngicos frente a *C. glabrata* sensíveis (GS) e resistentes (GR) ao fluconazol..... 51
- Tabela 6: Percentuais de sinergismo, indiferença e antagonismo resultantes das combinações de flucitosina, anfotericina, voriconazol, itraconazol, cetoconazol e caspofungina frente a *Candida glabrata* sensíveis (GS) e resistentes (GR) ao fluconazol. 52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	O gênero <i>Candida</i>	15
2.2	Candidíases	16
2.3	Aspectos gerais de <i>Candida glabrata</i>	17
2.4	Agentes Antifúngicos, Limitações e Resistências.....	24
2.4.1	Poliênicos	25
2.4.2	Antifúngicos Azólicos.....	27
2.4.3	Pirimidinas	30
2.4.4	Equinocandinas.....	30
2.5	Combinação de agentes antifúngicos	32
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo Geral.....	37
3.2	Objetivos Específicos	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Microrganismos.....	38
4.2	Agentes antifúngicos	38
4.3	Indução de resistência ao fluconazol <i>in vitro</i> (Fekete-Forgács et al, 2000)	38
4.4	Testes de suscetibilidade aos antifúngicos.....	39
4.4.1	Preparação do Inóculo.....	39
4.4.2	Preparação das microplacas.....	40
4.4.3	Inoculação	40
4.4.4	Incubação e leitura das microplacas	40
4.5	Avaliação das associações de antifúngicos frente a <i>Candida glabrata</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol.....	41
5	RESULTADOS.....	42
5.1	Indução de resistência ao fluconazol <i>in vitro</i>	42
5.2	Testes de suscetibilidade aos antifúngicos.....	42
5.2.1	Suscetibilidade <i>in vitro</i> a anfotericina B	43
5.2.2	Suscetibilidade <i>in vitro</i> a caspofungina	44
5.2.3	Suscetibilidade <i>in vitro</i> a cetoconazol.....	44
5.2.4	Suscetibilidade <i>in vitro</i> a flucitosina.....	44

5.2.5	Suscetibilidade <i>in vitro</i> ao itraconazol.....	45
5.2.6	Suscetibilidade <i>in vitro</i> ao voriconazol.....	45
5.3	Avaliação das associações de antifúngicos frente a <i>C. glabrata</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol.....	46
5.3.1	Atividade <i>in vitro</i> de combinação de anfotericina B e antifúngicos.....	46
5.3.2	Atividade <i>in vitro</i> de combinação de flucitosina e antifúngicos	48
5.3.3	Atividade <i>in vitro</i> de combinação de voriconazol e antifúngicos	50
6	DISCUSSÃO.....	53
6.1	Considerações finais	63
6	CONCLUSÕES	64
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

A frequência de micoses invasivas devido a fungos oportunistas tem aumentado substancialmente nas duas últimas décadas. Este expressivo aumento corresponde também a uma elevação nas taxas de mortalidade, evidenciando que o número de pacientes com riscos de desenvolver micoses oportunistas é crescente, portanto requer atenção (WARNOCK, 2007).

As candidíases emergiram como um problema médico significante a partir de 1982, pela prevalência das infecções oportunistas em pacientes infectados pelo vírus HIV e outros estados de imunossupressão (GROLL, 1998; SIDRIM & ROCHA, 2004). A espécie mais prevalente em candidiases é a *Candida albicans*; todavia, as espécies não-*albicans* têm emergindo de forma significativa, dentre elas *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. dubliniensis* (HAYNES, 2001; FERRAZA et al, 2005; TAMURA et al, 2007).

Candida glabrata era considerada como fungo leveduriforme não patogênico, saprófita do organismo humano, onde raramente era causadora de infecções graves no homem. Entretanto, esta espécie tem emergido como importante patógeno fúngico, e em muitos países destaca-se como o segundo agente mais isolado em episódios de candidíase, só superada por *C. albicans* (BADER et al, 2004; DAN et al, 2006). No Brasil, embora *C. glabrata*, acometa apenas 0,12 casos/1000 das candidemias, está relacionada com altas taxas de mortalidades e dificuldades de tratamento (SOBEL et al, 2000; COLOMBO et al, 2006). As infecções por *C. glabrata* apresentam uma resistência natural a antifúngicos do tipo azólicos, especialmente ao fluconazol, fato que tem destacado sua importância clínica (BENNETT et al, 2004). Em infecções sanguíneas por *C. glabrata*, a resistência ao fluconazol manifesta-se em 10% a 15% dos casos (PFALLER et al, 2002a).

A resistência de *C. glabrata* aos azólicos e, em menor grau, a outros antifúngicos, tem representado grande desafio para a clínica, frente às dificuldades observadas no tratamento de candidíases (DENNING et al, 1997; SANGUINETTI et al, 2005). Agravando esta situação está o arsenal antifúngico destinado a infecções sistêmicas, que continua limitado e com poucas opções aprovadas para uso clínico (JOHNSON et al, 2004; CAPPELLETY et al, 2007).

A combinação entre duas classes de antifúngicos, sobretudo aquelas com diferentes mecanismos de ação, pode gerar alternativas terapêuticas mais efetivas do que os tratamentos com antimicóticos administrados isoladamente. Tais incrementos no espectro antifúngico poderá superar problemas como a resistência aos agentes antifúngicos e, conseqüentemente, reduzir as taxas de mortalidade (MUKHERJEE et al, 2005). Entre as vantagens da terapia combinada destacam-se: o sinergismo entre os fármacos; redução da toxicidade a partir da administração de menores doses; redução do tempo relativo à resposta ao tratamento; redução do tempo de hospitalização; aumento do espectro de ação; e redução da aquisição de resistência fúngica aos antimicrobianos (JOHNSON et al, 2004).

Neste contexto, estudos *in vitro* objetivados a avaliar diferentes combinações de antifúngicos para espécies fúngicas problemáticas, como é o caso de *C. glabrata* com sua reconhecida facilidade de desenvolver resistência a azólicos, são pertinentes e atuais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao filo dos fungos imperfeitos, ordem *Cryptococcales* e família *Cryptococaceae*. Este gênero compreende mais de 200 espécies, das quais aproximadamente 10% são consideradas agentes etiológicos (CHAVES et al, 2003). Embora *C. albicans* seja a espécie mais frequentemente isolada de amostras clínicas, durante as últimas três décadas houve um aumento significativo nas espécies não-*albicans*, entre elas *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis* (HAYNES, 2001; FERRAZA et al, 2005; TAMURA et al, 2007).

Os fungos do gênero *Candida* constituem-se em células leveduriformes, elípticas ou esféricas, com diâmetro que varia de 3 a 6 µm, geralmente formam múltiplos brotos e pseudo-hifas. Em ágar Sabouraud suas colônias evidenciam cor branca ou branco-amarelada, e com aspecto cremoso (JOKLIK et al, 1995).

Hazen (1995) cita, em seu estudo de revisão sobre agentes leveduriformes emergentes que o grupo de leveduras potencialmente patogênicas ao homem é composto em sua grande maioria pelo gênero *Candida*. As espécies do gênero *Candida* fazem parte da microbiota humana da pele, do trato gastrointestinal e trato genitourinário. Como são fungos oportunistas, a transição da forma comensal desta levedura para a forma patogênica acontece em casos onde ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro; assim, o microrganismo se multiplica, invade a mucosa e causa infecção. O aumento do número de indivíduos imunocomprometidos tem determinado crescimento de infecções fúngicas, em particular, candidíase oral e sistêmica (SCHUMAN et al, 1998; BALKIS et al, 2002; BODEY et al, 2002; TRICK et al, 2002).

2.2 Candidíases

Segundo Lacaz et al (2002), candidíase ou candidoses são infecções provocadas por leveduras do gênero *Candida*, e envolvem um amplo espectro de doenças superficiais e invasivas oportunistas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco. As manifestações clínicas das candidíases são extremamente variadas, atingem a superfície cutânea ou membranas mucosas, resultando em: candidíase oral, candidíase vaginal, intertriginosa, paroníquia e onicomicose. Também podem ocorrer nas formas sistêmicas, como septicemia, endocardite e meningite (LACAZ et al, 2002; SIDRIM & ROCHA, 2004).

O homem é reservatório do gênero *Candida*, onde as infecções por este gênero constituem-se em 25% das micoses superficiais. As espécies deste gênero são encontradas no tubo gastrointestinal em 80% da população adulta saudável. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização por *Candida* na vagina (ABRAHAMSEN et al, 1992). Em hospitais o gênero *Candida* responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas, representando um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas que estas infecções representam (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

Numerosos fatores contribuem para as infecções por *Candida*, dentre os quais podemos destacar: o rompimento das barreiras cutânea e mucosa, disfunção dos neutrófilos, defeito na imunidade mediada por células, desordem metabólica, exposição direta aos fungos, extremos de idade (recém-nascidos e idosos), desnutrição aguda, longo tratamento com antibióticos, quimioterapia, transplantes, resistência a antifúngicos, dentre outros (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

Candidíases emergiram como um problema médico significativo ao término do século XX, pela prevalência das infecções oportunistas em pacientes infectados pelo vírus HIV e outros estados de imunossupressão (GROLL, 1998; SIDRIM & ROCHA, 2004).

A candidíase oral foi descrita como doença associada no primeiro caso de SIDA publicado, e constitui a infecção fúngica mais freqüente nos pacientes HIV-positivos (LUPETTI et al, 1995). Considera-se que até 90% dos indivíduos acometidos pelo vírus HIV sofrerão pelo menos um episódio de candidíase orofaríngea (SÁNCHEZ-VARGAS et al, 2002; URIZAR, 2002).

Em relação à candidíase vaginal estima-se que 20 a 25% das mulheres sadias e sem sintomas apresentam culturas positivas para *Candida*, e cerca de 75% das mulheres adultas tiveram episódios de candidíase vaginal durante a vida, das quais 5% tornam-se recorrentes. A recorrência desta infecção também está associada a algumas enfermidades como: *diabetes mellitus*, imunodepressão, terapia hormonal exógena e AIDS (CARDONA-CASTRO et al, 2002). A espécie *C. albicans*, ainda é a mais freqüente, entretanto *C. glabrata* representa 5 a 15% dos casos (BUZZINI & MARTINI, 2001).

Infecções de pele e mucosas por *Candida* podem ser documentadas em pacientes saudáveis, sem nenhuma doença de base, entretanto manifestam pequenas alterações locais de resposta do hospedeiro no sítio da infecção. Por outro lado, infecções sistêmicas por *Candida* podem comprometer vísceras como resultado de disseminação hematogênica. Complicações infecciosas são geralmente documentadas em pacientes críticos, como portadores de doenças que comprometam o estado imunológico (doenças degenerativas ou neoplásicas) (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

A candidemia é observada particularmente entre pacientes hospitalizados submetidos a terapias antimicrobianas por longos períodos, terapias imunossupressivas, nutrição parenteral e procedimentos invasivos (SIDRIM & ROCHA, 2004). A fungemia por *Candida* constitui-se um grande problema na maioria dos hospitais, pois geralmente é de difícil diagnóstico, além do alto custo de tratamento e altas taxas de mortalidade. Dentre as manifestações clínicas inclui-se a febre como a mais comum, porém podem tomar diversas formas e localizações (septicemia, pneumonia, endocardites, artrite, osteomielite, miosites, peritonites, meningites, dentre outras) (COLOMBO et al, 2006).

2.3 Aspectos gerais de *Candida glabrata*

A *Candida glabrata*, como as outras espécies do gênero *Candida*, pertence à classe *Fungi imperfecti*, ordem *Moniliales* e da família das *Cryptococcaceae*. A sua maior diferença morfológica entre as espécies de *Candida*, é a característica de não apresentar dimorfismo. Conseqüentemente, esta levedura não se diferencia do estado comensal do patogênico, pois, em ambos os estados, ela se encontra apenas na forma de pequenos blastoconídios que variam

de 1 a 4 µm de tamanho (FIDEL et al, 1999; CSANK & HAYNES, 2000; GUBBINS & ANAISSIE, 2002).

De fato, *C. glabrata* foi pela primeira vez classificada em 1917 no gênero *Cryptococcus* e logo mais, no ano de 1938, no gênero *Torulopsis*, decorrente da sua falta de produção de pseudohifas. No entanto, mais tarde foi observado que esta levedura forma pseudohifas em ágar contendo baixa concentração de amônia (CSANK & HAYNES, 2000; VANDEPUTTE et al, 2007). Mesmo depois de determinada sua capacidade de produzir pseudohifas, este não foi um fator de confiança para distinguir os membros do gênero *Torulopsis*, e então, *Candida glabrata* e foi reclassificada no gênero *Candida* (ODDS et al, 1997; ONYEWU et al, 2003).

A relação evolutiva do gênero *Candida* foi comparada por Barns et al (1991) com base na homologia de seqüência 18S rRNA, e concluiu-se que apesar do seu nome, *C. glabrata* é evolutivamente mais relacionada a *Saccharomyces cerevisiae* do que outros fungos patogênicos, como *Candida albicans* (CHEN & CLARK-WALKER, 2000). Contrariamente a outras espécies de *Candida*, *C. glabrata* é uma levedura “petite-positivo”, uma característica também presente em *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, em contraste com *S. cerevisiae* que podem deslocar seu ciclo de vida entre as formas diplóide e haplóide de células, *C. glabrata* é exclusivamente um organismo haplóide e assexuada (WHELAN et al, 1984; BIALKOVÁ & ŠUBIK, 2006).

A seqüência do genoma de *C. glabrata* foi publicada em 2004. Este genoma conta com 13 cromossomos englobando um total de 12,3 Mbp e consiste cerca de 207 genes que codificam RNAt e 5.283 genes que codificam proteínas. Seu conteúdo GC é de 38,8%, que é semelhante ao de *S. cerevisiae* (38,3%). O genoma de *C. glabrata* e *S. cerevisiae* apresentam um elevado grau de semelhança (DUJON et al, 2004, BIALKOVÁ & ŠUBIK, 2006). No entanto, *C. glabrata* perdeu muitos genes do metabolismo, tais como genes envolvidos na assimilação de galactose, sacarose, fosfato, nitrogênio, enxofre, tiamina, piridoxina, ácido nicotínico. *C. glabrata* assimila somente 2 açúcares, glicose e trealose, um limitado número quando comparado com *C. albicans* e *S. cerevisiae* (FIDEL et al, 1999).

Apesar de *C. glabrata* ser filogeneticamente mais próxima de *S. cerevisiae* do que de outras espécies de *Candida*, *C. glabrata* é mais patogênica, pois, pode causar infecção em seres humanos como *C. albicans*. É provável que as diferenças no genoma entre *S. cerevisiae* e *C. glabrata* e as semelhanças entre a *C. glabrata* e *C. albicans* caracterizem a patogenicidade de *C. glabrata* (FIDEL et al, 1999; KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002).

Existem poucas investigações sobre os fatores de virulência da *C. glabrata*. A incapacidade na formação de hifas e pseudohifas, evidenciar antígenos também presentes em *C. albicans*, e a pouca aderência a células endoteliais levam a considerá-la menos virulenta (FIDEL et al, 1999). As fosfolipases podem ser consideradas potenciais fatores de virulência porque facilitam a infiltração do fungo através da barreira fosfolipídica das células epiteliais; no caso de adesão a trombócitos, estes favorecem a disseminação da levedura no sangue (GHANNOUM, 2000; ROBERT et al, 2000). A presença de proteínas hidrofóbicas na superfície de *C. glabrata* pode auxiliar na aderência desta espécie às células hospedeiras através de receptores específicos como as adesinas e proteínas formadoras de biofilme (WEIG et al, 2004).

A identificação *C. glabrata* pode ser realizada através de métodos microbiológicos e bioquímicos; todavia, é cada dia mais frequente a utilização de métodos imunológicos e moleculares. O cultivo em meios especiais contendo um substrato cromogênico, como o CHROMagar *Candida* tem sido utilizado como indicador de *C. glabrata* de outras espécies de leveduras como *C. albicans* e *C. tropicalis* em culturas mistas (BAUMGARTNER et al, 1996; BOUCHARA et al 1996; WILLINGER & MANAFI1999). A identificação bioquímica é baseada na capacidade de *C. glabrata* assimilar apenas trealose e glicose, o que a diferencia de outras espécies (PIENS et al 2003). A filamentação em soro ou prova do tubo germinativo é uma prova clássica que tem sido utilizada como complementar quando se utiliza microtestes comerciais como API *Candida* (bioMérieux), API20C Aux (bioMérieux), Auxacolor (BioRad), Fungichrom I (International Microbio), twin Fungifast I (International Microbio), Fermento cartão Vitek Bioquímica (bioMérieux), Vitek 2 ID-YST (bioMérieux), ID 32 C (bioMérieux), Fermento Plus Rápida (Diagnósticos Inovadores), Mycotube (Roche), Rosco comprimido de diagnóstico (EuroBio), *Glabrata* RTT (FUMOUCZE Diagnostics) (BIALKOVÁ & ŠUBIK, 2006).

Entre os métodos moleculares baseados na amplificação do DNA, a reação da cadeia da polimerase (polymerase chain reaction (PCR)) seguida de hibridização multiplex tem sido também frequentemente utilizada. Este método permite a identificação das diferentes espécies de leveduras patogênicas diretamente em amostras teciduais. O método é baseado na amplificação de regiões específicas do DNA cromossômico (ITS1 e ITS2 – região espaçadora transcrita interna, entre 5.8S-18S e 18S-28S rRNA, respectivamente; gene 18S; gene TOPII topoisomerase-II) e hibridização dos amplicons com sondas de DNA conhecidos derivados de patógenos mais frequentes (WAHYUNINGSIH et al, 2000; MASSONET et al, 2004;

KAMIYA et al, 2005; LIGORI et al, 2007). Os produtos de PCR podem ser detectados por eletroforese em gel de agarose (PCR-AGE) ou com o primer de cor marcada seguido pelo ensaio imunoenzimático colorimétrico (PCR-EIA) (COIGNARD et al, 2004). Outras técnicas de identificação moleculares incluem: eletroforese em gel de campo pulsátil (*pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE), a amplificação aleatória de DNA polimórfico (*random amplification of polymorphic*- RAPD), análise de restrição enzimática (*restriction enzyme analysis* - REA). (ARIF et al, 1996; FIDEL et al, 1999; ELIE et al, 1999).

Juntamente com a identificação de *Candida glabrata*, a determinação da suscetibilidade do isolado também é útil para a prescrição de um tratamento adequado. Técnicas como microdiluição em caldo, E-test e métodos de difusão em ágar podem ser utilizadas para testar a suscetibilidade aos antifúngicos disponíveis (REX et al, 2002; CLSI, 2008). A recente padronização dos testes de suscetibilidade para fungos leveduriformes determinou investimentos da indústria diagnóstica no lançamento de que testes comerciais que permitem uma rápida e segura determinação das concentrações inibitórias mínimas, mesmo em laboratórios clínicos hospitalares onde a rotina micológica é restrita; estes testes incluem: Candifast, ATB Fungus, Teste Diff, Mycostandard, Mycototal (BIALKOVÁ & ŠUBIK, 2006).

Historicamente *Candida glabrata* era considerada fungo leveduriforme não patogênico, saprófita do organismo humano, onde raramente era causadora de infecções graves em humanos. Entretanto, esta espécie tem emergido como importante patógeno fúngico, e em muitos países destaca-se como o segundo agente mais isolado em episódios de candidíase, depois de *C. albicans* (BADER et al, 2004; DAN et al, 2006). Acomete pacientes imunocomprometidos, particularmente aqueles em estados neotrópicos, na pré-maturidade, prolongada hospitalização, utilização prévia de antibióticos e utilização do fluconazol tanto em uso terapêutico quanto profilático (SOBEL et al, 2000; GUBBINS & ANAÏSSIE, 2002).

Nas candidemias, o quadro clínico determinado por *C. glabrata*, é praticamente indistinguível das infecções causadas por *C. albicans*. *C. glabrata* pode causar fungemia evidenciando quadro clínico com febre, tremores, ou choque séptico (GUMBO et al, 1999). Outras formas menos frequentes de infecção incluem raros casos de endocardite causados por *C. glabrata*, infecções de feridas pós-operatórias, peritonites e infecções pélvicas, urinárias e biliares (FIDEL et al, 1999).

Contrastando com as demais espécies de *Candida*, as infecções por *C. glabrata* são difíceis de tratar e muitas vezes são resistentes a muitos agentes antifúngicos azólicos, em

especial ao fluconazol. Por conseguinte, infecções por *C. glabrata* evidenciam elevadas taxas de mortalidade em pacientes hospitalizados com situações de riscos (SOBEL et al, 2000; COLOMBO et al, 2006; TUMBARELLO et al, 2008).

Alguns autores relataram maiores taxas de mortalidade nas candidemias associadas a *C. glabrata* do que naquelas causadas por *C. albicans* (KOMSHIAN et al, 1989; FIDEL et al, 1999; ALONSO-VALE et al, 2003). Gumbo et al (1999) relataram elevas taxas de mortalidade por *C. glabrata*, atingindo 44% dos óbitos. Dentre os fatores associados à mortalidade estão: internação na UTI, cirurgia abdominal, insuficiência renal, o tratamento prévio com fluconazol, e baixas doses de anfotericina B .

Uma característica das infecções por *C. glabrata*, tanto nas invasivas quanto nas de mucosas, é a apresentação de infecção polimicrobiana, simultânea ou sequencialmente, após bacteremia ou bacteriúria (KAUFFMAN et al, 2000) ou infecção mista envolvendo *C. glabrata* e *C. albicans* concomitantemente (KAMIYA et al, 2005; LIGORI et al, 2007).

C. albicans é, ainda, a mais recorrente das espécies de *Candida* em episódios de candidemias, porém segundo Trick et al (2002), desde 1993, a incidência de *Candida glabrata* tem aumentado neste tipo de infecção, embora o mesmo tenha sido geograficamente determinado. De modo geral, na América do Norte e Europa, *C. glabrata* se impõe como a 2ª espécie mais envolvida em candidíases, muitas delas com risco de morte (WILSON et al, 2005; WARNOCK, 2007).

No Brasil, Colombo e colaboradores (2006) avaliando a etiologia das candidemias em 11 centros médicos brasileiros, evidenciaram que *C. glabrata* ocupa o 5º lugar (4,9%) entre os agentes de candidemia. Todavia, este percentual corresponde a 0,12 casos/1000 o que é similar aos países europeus e América do Norte. As causas de *C. glabrata* ser incomum no Brasil não estão claras.

A resistência aos antifúngicos tem representado um grande desafio para a clínica, frente às dificuldades observadas no tratamento das candidíases. As infecções por *C. glabrata* são especialmente importantes porque esta espécie apresenta uma resistência inata a agentes antifúngicos como os azóis (DENNING et al, 1997; SANGUINETTI et al, 2005). Comparando com outras espécies de *Candida*, os isolados de *C. glabrata* tendem a apresentar as maiores Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) quando testados frente a azóis, sendo naturalmente menos sensíveis a todos os agentes antifúngicos, incluindo anfotericina B. As CIMs de fluconazol para *C. glabrata* são, aproximadamente, 16 vezes maiores do que as

requeridas por *C. albicans*; este fato vem representar uma seleção de espécies durante o uso profilático de fluconazol (ZEPELIN et al, 2007; GARNACHO-MONTERO et al, 2010).

Quando se aborda o termo resistência entre espécies de *Candida*, cabe também diferenciar resistência primária ou intrínseca da resistência secundária ou adquirida. A resistência intrínseca é a resistência natural ou inata de uma espécie frente a terapia antimicrobiana, mesmo que o microrganismo nunca tenha tido contato com o agente antifúngico (LEWIS, 2009). Em contraste, a resistência adquirida se desenvolve em organismos em que anteriormente eram sensíveis e após a exposição a um agente antimicrobiano tornam-se resistentes. Assim, a utilização prévia de antifúngicos pode selecionar espécies menos sensíveis como *C. glabrata*. As bases moleculares para o desenvolvimento de resistência intrínseca de *C. glabrata* a antifúngicos tem sido estudadas (BENNETT et al, 2004; SANGLARD et al, 1999; VERMITSKY et al, 2004).

Em *C. glabrata*, a expressão de bombas de efluxo de drogas e a super expressão do gene que codifica a lanosterol demetilase, são os dois mecanismos mais conhecidos de resistência ao fluconazol (SANGLARD et al, 2001).

Segundo Pinjon e colaboradores (2005) os quatro principais mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da resistência aos azólicos em *Candida* são: (1) efluxo de droga, (2) alterações na expressão gênica da enzima lanosterol demetilase, (3) mudanças de aminoácidos na lanosterol demetilase, (4) alterações na biossíntese de esteróis. A resistência dos fungos a azólicos está muito associada a regulação de bombas de membrana associadas a proteínas, conseqüentemente, o efluxo de uma ampla gama de moléculas, incluindo azóis. Estas proteínas de transporte são compostas por membros da família ABC (ATP-binding cassette) ou *major facilitator superfamily* (MFS). Os transportadores ABC são encontrados normalmente na membrana plasmática e membranas das organelas de todos os organismos (SANGLARD et al, 2001; GAUR et al, 2005).

Sob condições *in vitro* a elevada frequência da resistência de *C. glabrata* aos azólicos tem sido descrita em vários estudos. Um destes estudos observou o fenótipo de *C. glabrata* para resistência, onde ficou evidenciado que o tratamento desta levedura com subdoses de azólicos, está associado com a superexpressão de genes para transportadores ABC (responsáveis pelo efluxo) (SANGLARD et al, 1999, 2001). Sanglard et al (1999) observaram que quando um isolado de *C. glabrata* é exposto ao fluconazol em concentração de 50 mg / mL, determina resistência para este antifúngico e a outros azóis, com uma frequência alta. Ainda, a supressão do gene CgCDR1 mutante pode desenvolver uma resistência a azóis em

um meio contendo fluconazol em uma menor concentração de 5 mg / mL , devido a um gene do transportador do tipo ABC distintas semelhantes a CgCDR1, chamado CgCDR2 (sinônimo PDH1) (MIYAZAKI et al, 1998).

Vários transportadores são envolvidos no surgimento de resistência em diversos fungos, porém apenas quatro tipos de transportadores têm sido implicados na resistência de *C. glabrata* ao fluconazol: são os transportadores ABC CgCdr1p, CgPdh1p, CgSnq2p e CgAus1p. Análises do RNA de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol de isolados clínicos sugerem que a base predominante de resistência aos azólicos é a hiper-sensibilização de CgCDR1 e, em menor grau a de CgPDH1 (MIYAZAKI et al, 1998; SANGLARD et al, 2001; BENNETT et al, 2004; SANGUINETTI et al, 2005).

Outro mecanismo determinante da resistência aos azólicos está fortemente associado a um estado funcional da mitocôndria de *C. glabrata*. Foi demonstrado que a perda de DNA mitocondrial, gera um aumento na expressão de alguns genes envolvidos na resistência a antifúngicos, por *C. glabrata* se tratar de um fungo “petite positivo” (DEFONTAINE et al, 1999).

Juntamente com os genes que codificam o transportador de tipo ABC, outro *Candidato* é o gene ERG11 que codifica a enzima lanosterol 14 α -demetilase que também está diretamente ligada à resistência ao fluconazol (MARICHAL et al, 1997; HENRY et al, 2000). O mecanismo deste tipo de resistência refere-se a mutações no gene ERG11 e a super expressão do mesmo gene. Supõe-se também que as mitocôndrias funcionais possam ser responsáveis pela conversão dos precursores do ergosterol em esteróis tóxicos, por isso a perda da função mitocondrial é o resultado da pressão de seleção causada pelo uso excessivo dos azóis (KONTOYANNIS, 2000).

C. glabrata também é capaz de utilizar o colesterol ou outros precursores do ergosterol do hospedeiro, quando a biossíntese de ergosterol é bloqueada (após a supressão do gene ERG11 (codifica a lanosterol 14 α -demetilase) e do gene ERG9 (codifica a esqualeno sintase) (NAKAYAMA et al, 2001). Experimentos *in vivo* revelaram que *C. glabrata* acumula precursores anormais de ergosterol que são diferentes dos acumulados em *S. cerevisiae* e *C. albicans* após tratamento com fluconazol (KELLY et al, 1995).

2.4 Agentes Antifúngicos, Limitações e Resistências

Embora o número de antifúngicos tenha aumentado nos últimos anos, o tratamento das infecções fúngicas é ainda limitado a apenas 15 agentes atualmente aprovados para uso clínico. As classes terapêuticas hoje disponíveis resumem-se a: alilaminas (terbinafina); antimetabólicos (fluocitosina); azólicos (fluconazol, cetoconazol, itraconazol, ravuconazol, voriconazol, posaconazol); inibidores da síntese de glucana (caspofungina, micafungina e anidulafungina); poliênicos (anfotericina B, anfotericina B complexo lipídico, anfotericina B dispersão coloidal, anfotericina B lipossomal e nistatina lipossomal) (JOHNSON et al, 2004; CAPPELLETY et al, 2007).

Além do mais, o tratamento bem sucedido não só depende da suscetibilidade do organismo ao antifúngico, mas também depende do sistema imune do hospedeiro, da penetração e distribuição de medicamentos, e do foco infeccioso estar ou não protegido (BEN-AMI et al, 2008).

As semelhanças entre as células de fungos e células de mamíferos tem tornado o desenvolvimento da antifungicoterapia difícil, pois ambas são células eucarióticas com organelas semelhantes, incluindo-se também a replicação do DNA e síntese protéica. Por outro lado, as diferenças entre as paredes celulares dos mamíferos e dos fungos permite que os processos de síntese dos componentes da parede celular dos fungos torne-se alvo para antifúngicos, sem comprometer as células dos mamíferos. Por isto, inibidores da biossíntese da parede celular bacteriana, como as penicilinas, foram utilizados há anos devido a baixa toxicidade associada. Outros alvos de antifúngicos incluem agentes inibidores da biossíntese de DNA, a perturbação dos fusos mitóticos e interferência no metabolismo intermediário. A diferença mais amplamente explorada entre as células de mamíferos e a dos fungos é o fato da membrana celular fúngica conter ergosterol e outros esteróis em oposição ao colesterol presente nas células dos mamíferos (BRANCH et al, 1988; PAPPAS et al, 2009).

2.4.1 Poliênicos

Até 1940, poucos agentes antifúngicos estavam disponíveis para o tratamento das micoses sistêmicas. Neste contexto, o desenvolvimento dos antifúngicos poliênicos, especialmente a anfotericina B em 1956, representou um grande avanço na micologia médica, uma vez que foi o agente mais utilizado no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas até o início da década de 1990 (MAERTENS, 2004).

Os dois poliênicos comercialmente disponíveis são nistatina e anfotericina B. Seu mecanismo de ação é baseado na formação de poros aquosos formados por anéis de oito moléculas de poliênicos ligadas hidrofobicamente aos esteróis da membrana citoplasmática do fungo, acarretando a morte celular através da desestabilização desta membrana seguida de alteração de permeabilidade e extravasamento de componentes citoplasmáticos vitais ao fungo (CATTALÁN & MONTEJO, 2006; BEN-AMI et al, 2008).

Devido à toxicidade de nistatina, este poliênico só é utilizado como antifúngico tópico. A anfotericina B não é absorvida por via oral ou intramuscular, requerendo, portanto, administração intravenosa, intratecal ou através da rota inalatória. A anfotericina B é um antifúngico de amplo espectro, ativo sobre varias micoses como candidíases, aspergilose, blastomicose, coccidioidomicose, criptococose, histoplasmose, paracoccidioidomicose, esporotricose, e zigomicose (GUBBINS & ANAÏSSIE, 2002).

Devido a insolubilidade em água, a anfotericina B requer solubilização em meio contendo deoxicolato, o que faz do desoxicolato de anfotericina B, a forma farmacêutica mais comum; todavia esta forma permite que a anfotericina B se ligue ao colesterol das membranas celulares dos mamíferos, o que determina a maioria de seus efeitos adversos. A nefrotoxicidade, é uma das principais complicações que deve ser levada em consideração, sendo decorrente do efeito da anfotericina B diretamente nas células tubulares renais, resultando em necrose tubular aguda, vasoconstrição e redução da filtração glomerular. Conseqüentemente, a incidência de falência renal aguda associada à terapia de anfotericina B leva a contribuir ao óbito (BATES et al, 2001). A redução da função renal ocorre em mais de 80% dos pacientes que recebem a droga, e mesmo após o término da utilização do antifúngico alguns pacientes permanecem com comprometimento da filtração glomerular (BRANCH, 1988).

Devido ao excelente espectro de ação antifúngica e aos severos efeitos adversos, a indústria farmacêutica desenvolveu novas formas de apresentação da anfotericina B como: anfotericina B complexo lipídico (ABCL), anfotericina B em dispersão coloidal (ABCD) e ainda a forma lipossomal (L-Amb). Embora todas mantenham o mesmo espectro de atividade do desoxicolato de anfotericina B, as formulações lipídicas parecem ser mais potentes, menos nefrotóxicas e diferem entre si com respeito a propriedades bioquímicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas (REX et al, 2001; DUPONT, 2002).

Poucos isolados clínicos de *Candida* têm sido caracterizados como resistentes a anfotericina B, pois os documentos M27-A3 e M38-A2 do CLSI que padronizam as técnicas para testes de suscetibilidade, respectivamente de fungos leveduriformes e filamentosos, não apresentam breakpoints para a classificação dos isolados em sensíveis ou resistentes. Por outro lado, vários autores propõem que CIMs ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ seriam compatíveis com a resistência (ELIE et al, 1999). Todavia, esta CIM é com frequência determinada para uma variedade de fungos filamentosos como *Paecilomyces lilacinus*, *Scedosporium*, alguns *Aspergillus spp*, *Alternaria spp*, *Fusarium spp*, *Penicillium spp*, *Sporothrix schenckii* (ESPINEL-INGROFF et al, 2007).

Os casos de resistência a anfotericina B têm sido pouco descritos em *C. glabrata*, porém, de um modo geral, as CIMs de anfotericina B a *C. glabrata* são superiores às observados para *C. albicans* (OLSON et al, 2005). Estudos de suscetibilidade de *C. glabrata* têm mostrado que 61,9% dos isolados são sensíveis ao fluconazol e 75,2% é sensível a anfotericina B. Tais percentuais são ilusórios, pois, embora inicialmente sensíveis, os tratamentos rapidamente revertem o perfil de sensível para resistente (PFALLER et al, 2004a).

A redução ou falta de conteúdo de ergosterol na membrana plasmática da célula fúngica, tem sido associada à resistência, devido ao fato da afinidade de anfotericina B pelo ergosterol ser elevada e reduzida aos outros ergosteróis da membrana fúngica (fecosterol e episterol). Os mecanismos de alterações quantitativas do ergosterol são: (1) redução de ergosterol devido a inibição da sua síntese; (2) substituição de ergosterol por episterol e fecosterol ou outros esteróis; (3) alterações na relação de esteróis e fosfolipídeos (PEYRON et al, 2002). Poucos estudos tem focado os aspectos moleculares dos isolados resistentes a anfotericina B. Entretanto relaciona-se mutações nos genes ERG2 e ERG3 como responsáveis por alterações na biosíntese do ergosterol (HAYNES et al, 1996). Em *Candida spp* e em *Cryptococcus spp*, resistentes a poliênicos, o teor de ergosterol foi menor do que em isolados

sensíveis a poliênicos (KAHN et al, 2006). Ainda as alterações na síntese de glucanas bem como a formação de biofilmes são fenômenos que favorecem a emergência da resistência de *C. glabrata* à anfotericina B (LO et al, 2005).

2.4.2 Antifúngicos Azólicos

A segunda classe de antifúngicos que exerce atividade sobre a membrana celular dos fungos são os antifúngicos azólicos. Os azólicos constituem-se num grupo de drogas sintéticas fungistáticas, caracterizadas por apresentarem um anel imidazol ligados por ligação CN com outros anéis aromáticos. A natureza desses anéis aromáticos é de modificar as propriedades físico-químicas, aumentar a eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade. Dependendo do número de nitrogênio presentes no anel imidazol, estes agentes antifúngicos classificam-se em imidazólicos (miconazol, cetoconazol) quando houver apenas um átomo de nitrogênio e são chamados de triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol) quando a molécula apresentar 3 átomos de nitrogênio no anel azólico (CATTALÁN & MONTEJO, 2006)

A atividade antifúngica dos azólicos ocorre através de diversos mecanismos; o mais importante é a inibição da biossíntese do ergosterol, determinando alteração da permeabilidade de membrana, pois, os azóis se ligam às enzimas do citocromo P450 do fungo e inibem a desmetilação do lanosterol, um precursor do ergosterol (SPINOSA et al, 2002). Os triazólicos, sub-classe dos azólicos, representam novos antifúngicos com grande eficiência e baixa toxicidade. Diferentemente dos imidazóis, os triazóis tem alta afinidade pelo citocromo P450 fúngico não apresentando afinidade pelo citocromo P450 dos mamíferos. Em geral, os triazólicos demonstraram um espectro de atividade muito mais amplo e reduzida toxicidade quando comparados aos imidazólicos (SPINOSA et al, 2002).

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

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

A aprovação dos triazólicos, especialmente o fluconazol, no final dos anos 80 e início dos anos 90 implicou em grandes avanços no tratamento seguro e eficaz de infecções fúngicas locais e sistêmicas. O fluconazol, cobre muitas das deficiências dos imidazólicos. Diferente do cetoconazol, é altamente solúvel em água e pode ser administrado intravenosamente a pacientes seriamente doentes, não é alterado por mudanças na acidez gástrica e possui menor risco de hepatotoxicidade. Além disso, apresenta boa penetração no fluido cerebrospinal, alcançando níveis de quase 80% no sangue. Entretanto, muitas das mesmas interações medicamentosas apresentadas pelo cetoconazol são também possíveis para o fluconazol (PATTON et al, 2001; MAERTENS, 2004).

Contudo, o entusiasmo inicial pelo fluconazol foi desafiado por dois eventos: o envolvimento de um maior espectro de patógenos nas infecções fúngicas e a emergência da resistência aos azólicos. Isso porque, embora *C. albicans* permaneça a levedura mais comumente encontrada, este antifúngico apresenta restrições para infecções causadas por *C. krusei*, *C. glabrata* e *Aspergillus* spp (HAJJEH et al, 2004; COLOMBO et al, 2007).

A espécie *C. glabrata* além de ser menos susceptível ao fluconazol demonstra uma capacidade de tornar-se rapidamente resistente ao fluconazol e, cruzadamente, aos demais azólicos. A exposição de *C. glabrata* a sub-doses de fluconazol pode resultar em uma resistência adquirida. Estudos clínicos têm mostrado que a frequência de colonização e infecção de pacientes com *C. glabrata* pode ser aumentada em populações submetidas a profilaxia com fluconazol. (BENNETI et al, 2004). Ainda, Pfaller e colaboradores (2004b) observaram que o fluconazol pode servir como um marcador para prever a suscetibilidade de *Candida* spp, a antifúngicos do tipo azólicos em presença de resistência cruzada de fluconazol e novos triazólicos.

O itraconazol, por sua vez, gradualmente substituiu o cetoconazol como tratamento de escolha para casos não-invasivos de histoplasmose, blastomicose e paracoccidiodomicose. É um derivado dos triazóis com atividade semelhante ou superior ao fluconazol, mas com uma

farmacocinética muito semelhante ao cetoconazol. Como o cetoconazol, é uma base fraca, por isso requer um meio ácido para absorção e tem os mesmos inconvenientes, como a reduzida absorção em pH gástrico mais elevado. Tal como acontece com o cetoconazol, é altamente lipossolúvel, assim a difusão do LCR e filtração de urina são mínimas. É extensivamente metabolizado no fígado (foram documentados até 30 metabolitos) (ABETE, 1998). Por causa da errática absorção e baixas concentrações sanguíneas estarem associadas à falhas terapêuticas, foi desenvolvida uma formulação oral contendo hidroxipropil- β -ciclodextrina como solubilizante, cuja biodisponibilidade é significativamente maior do que a apresentada pelas cápsulas (TERRELL, 1999).

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

Aprovado em 2002, o voriconazol, estruturalmente relacionado ao fluconazol, é oralmente e parenteralmente ativo; e diferentemente do itraconazol, sua absorção não é afetada pelo pH gástrico (JEU et al, 2003). É um triazólico de segunda geração derivado de fluconazol, mas com uma potência e espectro de atividade muito maior. Este antifúngico difere do fluconazol pela substituição de um anel triazol e um n-fluoropirimidina. Estas alterações moleculares conferem ao voriconazol uma potente ação fungicida contra fungos filamentosos como *Aspergillus* e *Fusarium*. A sua ação contra leveduras é principalmente fungistática embora tenha sido relatado que alguns isolados de *Candida* são refratários ao voriconazol (QUINDÓS et al, 2007). Apesar da eficácia, segurança e amplo espectro, o voriconazol ainda não é o azólico ideal porque ainda apresenta interações medicamentosas e efeitos colaterais clássicos dos azólicos (GUPTA et al, 2005).

Frente aos novos triazólicos como o voriconazol, ravuconazol e posaconazol, *C. glabrata* tem sido significativamente mais sensível do que ao fluconazol. Deste modo, o voriconazol foi sugerido como alternativa terapêutica frente a *C. glabrata* fluconazol-resistentes. Por outro lado, quando se comparam as concentrações inibitórias mínimas (CIMs), há evidentes correlações entre voriconazol com as CIMs frente ao fluconazol, comprovando a resistência cruzada BENNETT et al, 2004). Em revisão Quindós et al (2007) cita que 5 a 10% dos isolados de *C. glabrata* são resistentes *in vitro* ao voriconazol (CIM \geq

2,0 µg/mL), e este percentual sobe para 60% quando se trata de isolados resistentes ao fluconazol.

2.4.3 Pirimidinas

A 5-fluorocitosina é um pró-fármaco sendo o único representante da classe das pirimidinas. A ação antifúngica da flucitosina ocorre através da sua conversão, no citoplasma fúngico, em 5 fluoracil, o qual, por sua vez é convertido em 5-fluoro-2'-deoxiuridina 5'-monofosfato, um antimetabólito que inibe a timidilato sintetase, enzima que é fundamental na síntese do DNA fúngico (SPINOSA et al, 2002). O agente pirimidínico possui excelente espectro de atividade e potência frente a espécies de *Candida* (exceto *C. krusei.*) e outros fungos leveduriformes. Este antimicótico está disponível apenas por via oral e tem uma meia-vida curta, portanto, deve ser administrado com frequência. Uma das suas vantagens é de produzir poucos efeitos tóxicos (PAPPAS et al, 2009).

A utilização de flucitosina como único agente no tratamento de micoses não é recomendado uma vez que uma alta prevalência de resistência primária e secundária está associada a esse fármaco (DENNING et al, 1997; PATON et al, 2002). Denning et al (2007), relatou que em isolados de *Candida* spp (especialmente *C. glabrata*) depois de expostos a monoterapia por flucitosina evidenciaram resistência a este antifúngico. Por outro lado, a sua combinação com anfotericina B ou azólicos é considerada bastante útil no tratamento de micoses invasivas causadas por espécies de *Candida* e *Cryptococcus* (SCHWARZ et al, 2003).

2.4.4 Equinocandinas

A mais nova classe de antifúngicos é representada pelas equinocandinas (micafungina caspofungina, e anidulafungina) e constiu-se na única classe de inibidores da parede celular fúngica. O mecanismo de ação destes antifúngicos se dá a partir da inibição não competitiva da enzima β -1,3-glucana sintase, que catalisa a polimerização da glicose-uridina-difosfato (UDP-glicose). Quando a síntese deste polímero é inibida, ocorre o

extravasamento de componentes da célula, como resposta a elevada pressão osmótica exercida sobre a parede celular enfraquecida (DOUGLAS et al, 1997; BARTIZAL et al, 1997).

Todas as equinocandinas estão disponíveis em preparações parenterais e como agem sob estruturas específicas fúngicas possuem poucos efeitos colaterais. As equinocandinas têm atividade contra a maioria das espécies de *Candida*, mas tem menor atividade contra alguns isolados de *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii* (PFALLER et al, 2008; KRAUSE et al, 2004). As equinocandinas também são recomendadas como uma alternativa ao fluconazol para o tratamento primário para a maioria dos adultos não neutropênicos com candidemias ou suspeita de doença invasiva. Para o tratamento de candidemias em pacientes neutropênicos, as equinocandinas constoem-se nos fármacos de escolha (PAPPAS et al, 2009).

A caspofungina foi aprovada para o tratamento de candidemias, candidíase mucocutânea e aspergilose invasiva (PFALLER et al, 2003a). Provou ser altamente ativa frente a biofilmes de *C. albicans*, e uma de suas mais significantes vantagens é a maior atividade frente a isolados de *Candida* resistentes a azólicos (PFALLER et al, 2003a; PFALLER et al, 2004b). Não possui atividade contra *C. neoformans*, *Trichosporon* spp., *Rhizopus* spp e *Fusarium* spp. A caspofungina parece ser, similarmente, ativa frente a isolados sensíveis e resistentes a itraconazol e fluconazol (CATALÁN et al, 2006).

Anidulafungina, caspofungina e micafungina possuem excelente atividade *in vitro* contra *Candida* spp. (99,6% sensíveis); as exceções são as CIMs para *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii* (90% sensíveis). Embora a resistência *in vitro* para equinocandinas tem sido raramente relatada, Mouldgal et al (2005) observaram que em isolados de *Candida parapsilosis* resistentes ao fluconazol as CIMs para anidulafungina e caspofungina são mais elevadas, evidenciando uma resistência cruzada entre azólicos e equinocandinas. Por outro lado, Ruan et al (2007) avaliaram amostras de *C. glabrata* isoladas de pacientes internados em UTIs, e determinaram que a caspofungina é altamente eficaz contra infecções provocadas por isolados de *C. glabrata*.

A resistência microbiana é uma variável quantificável e é definida pela concentração inibitória mínima (CIM), a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe o crescimento de microorganismos. Há três termos usados para descrever a suscetibilidade de qualquer organismo a um determinado medicamento; "suspcetível", "intermediária" ("dose-dependente sensíveis" ou SDD) ou "resistentes". O Clinical and Laboratory Standards

Institute (CLSI) Subcomite de antifúngicos Testes desenvolvidos e microdiluição em caldo padronizado da macrodiluição, caldo e difusão em disco para o ensaio de suscetibilidade *in vitro* de espécies de *Candida* contra o fluconazol (REX et al, 2001; CLSI, 2002). A resistência ou a sensibilidade *in vitro* frente aos agentes antifúngicos pode não predizer a resposta clínica a infecção, porém é aceitável a relação entre elevadas CIMs e baixa resposta aos antimicrobianos (DANNAOUI et al, 1999).

2.5 Combinação de agentes antifúngicos

As elevadas taxas de mortalidade causadas pelas infecções fúngicas e a eficácia limitada dos antifúngicos disponíveis estimularam um grande interesse pelo uso de combinações entre antifúngicos no tratamento dessas infecções (JOHNSON et al, 2004). O FDA (Food and Drug Administration) aprovou vários agentes antifúngicos de várias classes (azóis, equinocandinas, pirimidinas, poliênicos) como opções terapêuticas para infecções fúngicas. Entretanto, muitas vezes o tratamento é complicado pela elevada toxicidade, baixa tolerabilidade ou limitado espectro de ação. Estas dificuldades têm conduzido esforços para avaliar a eficácia da terapia combinada no tratamento de infecções invasivas (MUKHERJEE et al, 2005).

O uso de combinações de antifúngicos com diferentes mecanismos pode aumentar as taxas de sucesso dos tratamentos, reduzir a duração da terapia, evitar o aparecimento de resistência medicamentosa, bem como expandir o espectro de atividade (BARCHIESI et al, 2004).

Vazquez (2003) em revisão sobre o assunto, aponta as principais vantagens para a utilização da associação de dois ou mais antifúngicos, entre elas: (1) a obtenção de atividade fungicida através da associação de dois agentes fungistáticos; (2) a possibilidade de diminuição da dosagem dos fármacos, diminuindo os efeitos colaterais e a toxicidade, mantendo a eficácia, e conseqüentemente retardando a emergência de mutantes resistentes ao fármaco; (3) a obtenção de um amplo espectro de tratamento para pacientes seriamente doentes suspeitos de estarem acometidos por infecções mistas ou infecções por patógenos resistentes. Por outro lado, o autor ainda salienta que a combinação de antifúngicos no tratamento das micoses pode acarretar desvantagens como: (1) a redução na eficácia clínica

através da interação antagonista dos agentes; (2) aumento do potencial para interações e toxicidades medicamentosas; (3) elevação dos gastos com medicamentos que juntos podem não possuir benefício clínico comprovado.

As dificuldades na utilização da combinação de antifúngicos têm conduzido os esforços recentes para determinar a eficácia da terapia combinada no tratamento de infecções invasivas. As justificativas mais comuns dos estudos que focam a terapia de combinação se baseiam em: 1) mecanismos de ação, que combinam agentes com alvos complementares no interior das células fúngicas (poliênicos mais azóis ou equinocandinas); 2) espectro de ação que combina potentes agentes contra organismos diferentes; 3) a estabilidade, farmacocinética, farmacodinâmica. Desta três razões principais, a maioria dos estudos de terapia combinada estão baseados na lógica da combinação de agentes que têm mecanismos de ação complementares. Assim pode-se ter maior potência do que o uso das drogas em monoterapia, melhoria na segurança e tolerabilidade, e a redução do número de organismos resistentes (LEWIS & KONTOYIANNIS, 2000).

Avaliações *in vitro* das interações medicamentosas são geralmente baseadas em "nenhuma interação" teoria, que pressupõe que a droga em combinação não interagem uns com os outros. Quando o efeito observado da combinação de drogas é maior do que o previsto a partir do "sem interação" tem-se o sinergismo. Por outro lado, o antagonismo é caracterizado quando o efeito observado é menor do que o previsto individualmente (GRECO et al, 1995). Apesar de várias categorias, incluindo "aditivo", "subaditivo" e "indiferente" terem sido utilizadas para descrever as interações medicamentosas intermediárias, o consenso foi o agrupamento de todas elas sob o título "nenhuma categoria de interação ou indiferença" (ODDS, 2003).

Foram desenvolvidos métodos *in vitro* para quantificar os efeitos das combinações antifúngicas sobre o crescimento fúngico, com a finalidade de prever a eficácia terapêutica. Um dos mais simples e conhecidos, utilizados na detecção da interação entre os fármacos é o método de "checkerboard". Diluições seriadas de antifúngicos em caldo são distribuídas bidimensionalmente em microplacas as quais são inoculadas com uma concentração padrão do microrganismo a ser testado, de modo que um grande número de concentrações de antifúngico pode ser avaliado simultaneamente (JOHNSON et al, 2004; MUKHERJEE et al, 2005).

Em geral, o método de "checkerboard" é fácil de realizar e interpretar, mas não fornece detalhes sobre as características farmacodinâmicas de combinações de antifúngicos. A

determinação das CIMs dos antifúngicos em combinação é geralmente seguido por uma análise mais aprofundada, utilizando as concentrações inibitórias fracionáveis (CIFs) de cada antifúngico e a partir destas, é possível calcular o índice de concentração inibitória fracional (ICIF) (BERENBAUM, 1978). A técnica de “checkerboard” permite o cálculo do ICIF para demonstrar se a CIM de um fármaco estará reduzida, inalterada ou aumentada na presença de outro fármaco (ODDS, 2003).

A maioria dos estudos que investigam a eficácia *in vitro* de antifúngicos em combinação deve interpretar os resultados em termos do ICIF, que é definido pela seguinte equação (MUKHERJEE et al, 2005)

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_A + \text{CIF}_B = \frac{\text{CIM}_A \text{ em combinação}}{\text{CIM}_A \text{ sem combinação}} + \frac{\text{CIM}_B \text{ em combinação}}{\text{CIM}_B \text{ sem combinação}}$$

Ao longo dos anos, vários investigadores têm classificado as interações entre agentes antifúngicos usando o ICIF em termos diferentes, levando a nomenclatura por vezes a interpretações confusas dos resultados. Recentemente, por razões de uniformização de interpretação, Odds (2003) propôs que um ICIF < 0,5 deve ser considerado uma combinação sinérgica; ICIF > 4 deve ser considerado antagonismo, e ICIF entre 0,5 e 4 deve ser considerado sem interação (indiferença). A facilidade do uso, simplicidade e viabilidade de desempenho tornam o ICIF um método vantajoso para a análise das interações medicamentosas na maioria dos laboratórios clínicos (JOHNSON et al, 2004).

O método de “checkerboard” também tem desvantagens significativas: 1) é dependente na determinação da escala de concentrações utilizadas para CIM e, portanto, pode levar a erros experimentais; 2) não permite a diferenciação entre a possibilidade de que em algumas combinações no tabuleiro de xadrez pode haver um sinergismo enquanto em outras concentrações pode haver indiferença ou antagonismo; 3) para algumas combinações de antifúngicos, a escolha da CIM como ponto final de leitura não é clara, levando a dificuldades no cálculo do ICIF; 4) não é passível de análise estatística; 5) a definição do ICIF varia muito entre os diferentes estudos (MELETIADIS et al, 2002; TE DORSTHORST et al, 2002).

As relações entre inúmeras combinações de antifúngicos têm sido caracterizadas em estudos *in vitro* frente a espécies de *Candida*. A maior parte dos estudos *in vitro* de interações de antifúngicos frente a *Candida* spp. investigaram as combinações entre polênicos e azóis. (JOHNSON et al, 2004). Entretanto neste tipo de combinação o efeito antagônico tem sido

observado em grande parte dos estudos (DUPONT & DROUHET, 1979; SUD & FEINGOLD, 1983; VAN ETTEN et al, 1991; MARTIN et al, 1994; VAZQUEZ et al, 1996; SAMARANAYAKE et al, 2001; SHIN & PYUN, 2004). O mecanismo do efeito antagônico é sugerido como resultante do bloqueio da síntese do ergosterol da membrana celular fúngica pelos azólicos, eliminando, assim, o sítio de ação da anfotericina B, que é o ergosterol presente na membrana plasmática. Vazquez et al (1996) ainda propõe que a exposição das células leveduriformes ao fluconazol ativa as bombas de efluxo, as quais direta ou indiretamente reduziriam a afinidade ou o impacto de anfotericina B na membrana celular. Por outro lado, a ausência de antagonismo entre poliênicos e azólicos (BOLARD, 1986) é explicada pelo fato de que a anfotericina B, também parece induzir ao extravasamento do material citoplasmático das células fúngicas sem a participação direta da ligação ao ergosterol. Ainda, a suscetibilidade das células fúngicas à anfotericina B dependeria não somente da quantidade de ergosterol, mas também da composição total de fosfolipídios da membrana fúngica. Os efeitos aditivos ou mesmo sinérgicos observados pela combinação desses agentes (ODDS, 1982; SUGAR 1991) é sugerido como resultante da desestabilização da membrana fúngica pela ligação do poliênico, facilitando a entrada do azólico.

Recentemente a anfotericina B tem sido testada em combinação com várias drogas para determinar se é possível ter melhores atividades quando usada em associação. A utilização de diferentes métodos de detecção do tipo de interação entre os fármacos também parece influenciar os resultados. Quanto à suscetibilidade das espécies de *Candida* aos azólicos, Ghannoum et al (1995) observaram que a combinação de anfotericina B com fluconazol resultava em efeito aditivo contra *C. albicans* em uma grande variedade de concentrações dos fármacos. Lewis et al (2002) verificaram que, com exceção de *C. glabrata*, o antagonismo era observado em isolados sensíveis ou sensíveis dose-dependentes ao fluconazol; enquanto que, para *Candida krusei* e *C. albicans* resistentes ao fluconazol, não era observado efeito antagonista frente a essa combinação. Por sua vez, Barchiesi et al (2004), avaliaram a associação do triazólico, voriconazol, com anfotericina B frente a isolados de *C. glabrata* e observaram um percentual de 10% de sinergismo nesta associação; o antagonismo não foi relatado no estudo pela técnica de “checkerboard”. No mesmo estudo esta associação foi avaliada por outro método, o de curva de morte, e a mesma exibiu interação sinérgica.

Além de prevenir o surgimento de isolados de *Candida* resistentes a flucitosina, a associação de anfotericina B com flucitosina representa uma combinação muito eficiente frente a espécies de gênero *Candida*. Johnson et al (2004) observaram a predominância de

sinergismo nos estudos *in vitro* com esta combinação, embora interações indiferentes também tenham sido relatados. Cabe ressaltar o antagonismo observado por alguns autores em situações onde ocorreu pré-exposição do micro-organismo a flucitosina. Em 1978 Polak já havia descrito o sucesso na combinação de poliênicos com flucitosina, relatando o sinergismo de anfotericina B e flucitosina no tratamento candidíases *in vivo*. Siau et al (1998) avaliaram o efeito das associações de flucitosina com anfotericina B através de técnicas com meio sólidos e meio líquido (“checkerboard”) frente a isolados de *C. glabrata*, relatando sinergismo, embora através dos meios sólidos esta interação não tenha sido confirmada.

Ghannoum e Isham (2003) avaliaram a associação de flucitosina com outros antifúngicos (anfotericina B e voriconazol) através da técnica de checkerboard frente a isolados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Os autores relataram que as interações de flucitosina com voriconazol ou anfotericina foram aditivas contra 50% dos isolados de *C. albicans*. Já a associação de anfotericina B e flucitosina frente a *C. glabrata* resultou em 50% de aditividade, sem presença antagonismo, enquanto que voriconazol + flucitosina resultou em 50% de indiferença e 50% de antagonismo frente a *C. glabrata*.

Embora as CIMs anfotericina B para *C. glabrata* sejam superiores as observadas para *C. albicans*, este poliênico é geralmente eficaz em infecções causadas por esta espécie. Da mesma forma, a caspofungina é ativa contra *C. glabrata*. Por se tratar de antifúngicos de mecanismos de ação diferentes a combinação entre elas trata-se de uma abordagem terapêutica útil em infecções de difícil de tratamento. Barchiesi et al (2005) demonstraram, através de métodos *in vitro* e *in vivo*, que a combinação de caspofungina e anfotericina B pode ser vantajosa em relação a monoterapia contra *C. glabrata*. Em outro estudo Hossain et al (2003) avaliaram a mesma combinação frente a isolados de *C. albicans* resistentes ao fluconazol e itraconazol através de técnicas de checkerboard, evidenciando que a combinação exibiu uma interação positiva, pois as CIMs caíram 2 vezes para caspofungina e 4 vezes para anfotericina B resultando em ICIF de 0,75. O mesmo autor avaliou a combinação *in vivo*, e relatou que a combinação prolongou a sobrevida dos ratos em tratamento, quando comparados com a utilização da monoterapia com anfotericina B.

Outra associação promissora com base nos diferentes alvos na célula fúngica, é a combinação de caspofungina e voriconazol. Kiraz et al (2010) relataram que a interação de caspofungina e voriconazol pode ser eficaz em infecções causadas por *C. glabrata*, em estudos baseados em curva de morte, E-test e disco difusão.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Comparar a suscetibilidade de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente a antifúngicos combinados.

3.2 Objetivos Específicos

1. Induzir a resistência ao fluconazol em isolados de *C. glabrata*;
2. Verificar a suscetibilidade de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol frente a fluconazol, itraconazol, voriconazol, flucitosina, caspofungina, cetoconazol, anfotericina B;
3. Avaliar a atividade das associações de anfotericina B com azólicos (cetoconazol itraconazol, e voriconazol), caspofungina e flucitosina em *C. glabratas* sensíveis e resistentes ao fluconazol;
4. Avaliar a atividade das associações de flucitosina com azólicos (cetoconazol e itraconazol), e caspofungina em *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol;
5. Avaliar a atividade das associações de voriconazol com o azólico (itraconazol) , caspofungina e flucitosina em *C. glabratas* sensíveis e resistentes ao fluconazol;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Foram utilizados trinta e quatro isolados de *C. glabrata*, todos sensíveis ao fluconazol, pertencentes à coleção de fungos do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI). As amostras foram coletadas de pacientes com candidemia sistêmica internados no Complexo Hospitalar Santa Casa em Porto Alegre/RS e Hospital Universitário de Santa Maria/RS. Também foram inclusos trinta e quatro isolados de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol, os quais foram obtidos pela técnica de indução de resistência *in vitro* proposta por Fekete-Forgács et al (2000). Como garantia de promover o controle de qualidade foi incluída *C. glabrata* ATCC 66032.

4.2 Agentes antifúngicos

Os antifúngicos, na forma de sais, foram obtidos de seus respectivos fabricantes. As soluções-estoques de fluconazol e flucitosina foram preparadas em água destilada, enquanto que as soluções de anfotericina B, caspofungina, cetoconazol, itraconazol e voriconazol requereram dimetilsulfóxido. As diluições intermediárias foram realizadas em Caldo RPMI 1640 tamponado com MOPS de acordo com a técnica empregada M27-A3 (CLSI , 2008).

4.3 Indução de resistência ao fluconazol in vitro (Fekete-Forgács et al, 2000)

As culturas de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol foram semeadas em tubos contendo Caldo Sabouraud e incubadas a 30°C “overnight”. As concentrações das culturas foram, a seguir, padronizadas em novos cultivos com Caldo Sabouraud com base na turvação ajustada

em espectrofotômetro para absorvância 0,1 no $\lambda = 640$ nm. Os cultivos padronizados foram incubados a 30°C e, após 10 horas, foi acrescentado fluconazol resultando em uma concentração final de 8 $\mu\text{g/mL}$. Decorridas 14 horas de incubação, as células das culturas contendo fluconazol foram novamente transferidas para tubos contendo Caldo Sabouraud e fluconazol 8 $\mu\text{g/mL}$ e novamente, incubadas a 30°C sob agitação de 120 rpm, durante 24 horas. Este procedimento foi realizado por 3 vezes consecutivas. Após a terceira incubação, as células foram transferidas para novos tubos contendo Caldo Sabouraud e fluconazol na concentração final de 8 $\mu\text{g/mL}$ a fim de que se obtivesse, em espectrofotômetro, uma absorvância final de 0,1 no $\lambda = 640$ nm. Depois de 10 horas de incubação, foi adicionado fluconazol suficiente para obtenção de 16 $\mu\text{g/mL}$ de fluconazol. Os cultivos foram incubados a 30°C por 24 horas sob agitação. Continuou-se duplicando a concentração de fluconazol até que se atingisse 64 $\mu\text{g/mL}$. As células do cultivo final foram semeadas em Ágar Sabouraud e mantidas como estoque para os ensaios frente a *C.glabrata* fluconazol-resistentes.

4.4 Testes de suscetibilidade aos antifúngicos

Foram realizados testes de suscetibilidade ao fluconazol e aos demais antifúngicos para confirmar a sensibilidade ou resistência para todos os isolados através da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as normas de padronização publicadas no documento M27-A3 (CLSI, 2008).

4.4.1 Preparação do Inóculo

Para preparação do inóculo foram realizados subcultivos das amostras de *C. glabrata* (sensíveis e resistentes ao fluconazol), em tubos estéreis com ágar Sabouraud dextrose, incubados a 35°C a 24 horas. A seguir, as colônias foram suspensas em 5mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5g/L NaCl). A suspensão resultante foi colocada em agitador de vórtex durante 15 segundos e a densidade celular foi ajustada com espectrofotômetro a fim de obter a transmitância equivalente a solução-padrão da escala de McFarland 0,5 (1×10^6 a 5×10^6

células por mL), em comprimento de onda de 530nm. A suspensão de trabalho foi preparada a partir da diluição 1:50 seguida de uma diluição de 1:20 do inóculo em meio líquido RPMI 1640, resultando em concentração de 1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL.

4.4.2 Preparação das microplacas

O teste de microdiluição foi realizado em placas de microdiluição estéreis, descartáveis, com 96 poços. As concentrações 2 vezes concentradas dos antifúngicos foram dispensadas nos poços das fileiras 1 a 10 das placas de microdiluição, em volumes de 100µL, com uma pipeta multicanal. As fileiras 11 e 12 representaram respectivamente os controles negativos e positivos. As concentrações finais dos antifúngicos foram de 0,003 a 2 µg/mL para flucitosina, 0,007 a 4,0 para itraconazol, anfotericina B, cetoconazol, caspofungina; 0,125 a 64 µg/mL para, voriconazol e 1 a 512 µg/mL para fluconazol. Algumas cepas requereram concentrações maiores ou menores das testadas inicialmente, portanto foram repetidos os testes com os isolados utilizando concentrações referentes às requeridas.

4.4.3 Inoculação

Cada poço da placa de microdiluição foi inoculado, com 100µL da correspondente suspensão do inóculo. Os poços controle de crescimento (controles positivos) continham 100 µL de meio estéril, isento de droga, e foram inoculados com 100 µL das suspensões dos inóculos. A amostra de *C. glabrata* ATCC 66032 foi testada da mesma maneira.

4.4.4 Incubação e leitura das microplacas

As placas de microdiluição foram incubadas a 35°C e as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) determinadas após 48h de incubação. Após a incubação, as CIMs para flucitosina, caspofungina e azólicos foram consideradas as menores concentrações dos

fármacos que evidenciaram 50% de inibição em relação a turvação dos controles positivos; enquanto que para anfotericina B, as menores concentrações que evidenciaram 100% de inibição. Os critérios de definição de suscetibilidade ao fluconazol, itraconazol, voriconazol e flucitosina utilizados foram aqueles sugeridos pelo CLSI (NCCLS, 2002; CLSI, 2006; CLSI, 2008).

4.5 Avaliação das associações de antifúngicos frente a *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol

A técnica de “checkerboard” (LEWIS et al, 2002) foi utilizada para avaliar os efeitos das associações de fármacos frente a *C. glabrata*:. [Anfotericina B + Caspofungina], [Anfotericina B + Cetoconazol], [Anfotericina B + Flucitosina], [Anfotericina B + Itraconazol], [Anfotericina B + Voriconazol], [Flucitosina + Caspofungina], [Flucitosina + Cetoconazol], [Flucitosina + Itraconazol], [Voriconazol + Caspofungina], [Voriconazol + Flucitosina] e [Voriconazol + Itraconazol]. As diluições de cada fármaco foram preparadas de modo que se obtivessem concentrações quatro vezes maiores do que as concentrações finais desejadas. Assim, volumes de 50 μ L de cada concentração de azólicos foram combinados com outros 50 μ L de cada diluição; a este volume foi somado 100 μ L de inóculo em caldo RPMI 1640 que foram depositados em cada poço da microplaca. A preparação dos inóculos, tempo e temperatura de incubação foram similares aos descritos nos testes de suscetibilidade. Para avaliar a interação entre os fármacos, a concentração inibitória fracionária (CIF) foi calculada para cada combinação. As CIFs foram calculadas para cada agente pela divisão da concentração inibitória de cada fármaco isolado pela concentração inibitória obtida pela associação. Os valores de CIF foram então somados para definir o índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) resultante da combinação. Sinergismo foi definido como $ICIF \leq 0,5$. A indiferença foi considerada quando $0,5 < ICIF < 4,0$, enquanto que antagonismo foi definido quando $ICIF \geq 4,0$.

5 RESULTADOS

5.1 Indução de resistência ao fluconazol in vitro

Para que cada isolado de *C. glabrata* exibisse concentrações inibitórias mínimas iguais ou superiores a 64 µg/mL frente ao fluconazol, foram necessários vinte dias de crescente exposição ao fluconazol. Os resultados do teste de suscetibilidade ao fluconazol estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1: Suscetibilidade (µg/mL) dos isolados de *C. glabrata* frente ao fluconazol antes (GS) e após (GR) a exposição ao fluconazol.

Grupos de isolados	Média geométrica (µg/mL)	Intervalo (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)
GS (n=34)	4,61	1-32	4	32
GR (n=34)	147,63	64 – 256	128	256

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

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

5.2 Testes de suscetibilidade aos antifúngicos

As concentrações inibitórias mínimas de *C. glabrata* frente a todos os agentes antifúngicos foram determinadas antes e depois da exposição crescente ao fluconazol. A suscetibilidade foi avaliada através do protocolo M27-A3 (CLSI, 2008). A Tabela 2 apresenta os resultados dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos, comparando-se o grupo sensível (GS) com o grupo resistente (GR).

Tabela 2: Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) *in vitro* dos isolados de *C. glabrata* aos agentes antifúngicos antes (GS) e depois (GR) de crescente exposição ao fluconazol.

Antifúngicos	Grupo de isolados	Média geométrica das CIMs ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo das CIMs ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Anfotericina B	GS	0,09	0,06 – 0,25	0,125	0,125
	GR	0,78	0,125 – 4	1	2
Caspofungina	GS	0,11	0,015 – 0,25	0,125	0,25
	GR	0,20	0,06 – 0,5	0,25	0,5
Cetoconazol	GS	0,88	0,25 – 8	1	4
	GR	4,70	1 – 32	4	16
Flucitosina	GS	0,03	0,015 – 1	0,031	0,062
	GR	0,03	0,003 – 0,125	0,031	0,062
Itraconazol	GS	0,22	0,06 – 1	0,125	0,25
	GR	2,26	0,5 – 16	0,25	0,5
Voriconazol	GS	0,39	0,06 – 2	0,5	2
	GR	6,52	1 – 128	8	16

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

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

5.2.1 Suscetibilidade *in vitro* a anfotericina B

Entre os isolados de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol (GS), a anfotericina B demonstrou uma elevada atividade antifúngica, com CIMs variando de 0,06 a 0,25 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de 0,125 $\mu\text{g/mL}$ inibiu 55,88%, esta consistindo na CIM₅₀ e CIM₉₀. Os isolados resistentes ao fluconazol requereram concentrações mais elevadas de anfotericina B para serem inibidos, conforme evidenciado pelos parâmetros: faixa de suscetibilidade (0,125 $\mu\text{g/mL}$ a 4 $\mu\text{g/mL}$), CIM₅₀ = 1 $\mu\text{g/mL}$; CIM₉₀ = 2 $\mu\text{g/mL}$ e média geométrica igual a 0,79 $\mu\text{g/mL}$. No grupo fluconazol-resistente, 20,58% dos isolados evidenciaram resistência a anfotericina B (CIM \geq 2 $\mu\text{g/mL}$). Ainda no GR, a elevação de valores das CIMs a anfotericina correspondeu a aumentos de 8,6 vezes na MG, de 8 vezes na CIM₅₀ e de 16 vezes na CIM₉₀.

5.2.2 Suscetibilidade *in vitro* a caspofungina

Considerando os testes de suscetibilidade a caspofungina no GS, as CIMs variaram de 0,015 a 0,25 $\mu\text{g/mL}$. Ainda, foi possível observar $\text{CIM}_{50} = 0,125 \mu\text{g/mL}$, $\text{CIM}_{90} = 0,25 \mu\text{g/mL}$ e média geométrica de 0,11 $\mu\text{g/mL}$. Os isolados fluconazol-resistentes também apresentaram alterações nas CIMs: intervalo de variação de 0,062 a 4 $\mu\text{g/mL}$, $\text{CIM}_{50} = 0,25 \mu\text{g/mL}$, $\text{CIM}_{90} = 0,5 \mu\text{g/mL}$ e média geométrica de 0,22 $\mu\text{g/mL}$. Apenas um isolado de *C. glabrata* resistente ao fluconazol desenvolveu resistência a caspofungina ($\text{CIM} \geq 2 \mu\text{g/mL}$) com $\text{CIM} = 4 \mu\text{g/mL}$. No GR o aumento das CIMs a caspofungina correspondeu a aumentos de 1,8 vezes na MG, 2 vezes na CIM_{50} e 2 vezes na CIM_{90} .

5.2.3 Suscetibilidade *in vitro* a cetoconazol

A atividade antifúngica do cetoconazol frente as amostras fluconazol-sensíveis (GS) apresentou CIMs variando de 0,125 a 8 $\mu\text{g/mL}$, $\text{CIM}_{50} = 4 \mu\text{g/mL}$, $\text{CIM}_{90} = 16 \mu\text{g/mL}$ e média geométrica de 0,88 $\mu\text{g/mL}$. As amostras de *C. glabrata* GR requereram concentrações mais elevadas de cetoconazol para serem inibidas. Dentre o grupo fluconazol-resistentes a média geométrica foi igual a 4,7 $\mu\text{g/mL}$, a segunda maior elevação deste parâmetro entre os antifúngicos envolvidos neste estudo. Houve uma grande alteração nos valores de CIM_{50} (4 $\mu\text{g/mL}$) e CIM_{90} (16 $\mu\text{g/mL}$). A acentuada elevação das CIMs de cetoconazol capazes de inibir o grupo resistente ao fluconazol revelou o surgimento de 5 (14,7%) isolados resistentes ao cetoconazol ($\text{CIM} \geq 16 \mu\text{g/mL}$). No GR o aumento das CIMs ao cetoconazol revelou um aumento na MG em 5,4 vezes, na CIM_{50} em 4 vezes e na CIM_{90} em 4 vezes.

5.2.4 Suscetibilidade *in vitro* a flucitosina

A flucitosina foi o antifúngico que apresentou a maior eficácia frente aos isolados de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol. A variação das CIMs para o grupo sensível (GS) frente a este antifúngico foi 0,015 a 1 $\mu\text{g/mL}$, e para o grupo das resistentes foi 0,003 a

0,125 µg/mL. Os parâmetros, média geométrica (0,03 µg/mL), CIM₅₀ (0,03 µg/mL) e CIM₉₀ (0,06 µg/mL) permaneceram constantes para ambos os grupos GS e GR frente a flucitosina. Todos os isolados de *C. glabrata* sensíveis e resistentes apresentaram CIMs < 32 µg/mL, portanto nenhum isolado apresentou resistência a flucitosina.

5.2.5 Suscetibilidade *in vitro* ao itraconazol

As CIMs do itraconazol frente aos 34 isolados sensíveis ao fluconazol (GS), evidenciaram variações de 0,06 a 1 µg/mL, CIM₅₀ = 0,25 µg/mL, CIM₉₀ = 1 µg/mL e média geométrica igual a 0,22 µg/mL. Ainda, no grupo inicial de isolados sensíveis ao fluconazol, detectou-se quatro (11,76%) isolados resistentes ao itraconazol (CIM ≥ 1 µg/mL). No grupo das amostras resistentes ao fluconazol (GR) observaram-se variações de CIMs de 0,5 a 16 µg/mL; CIM₅₀ = 2 µg/mL; CIM₉₀ = 16 µg/mL e média geométrica igual a 2,26 µg/mL. Apenas cinco (14,7%) isolados resistentes ao fluconazol mantiveram-se sensíveis ao itraconazol, as quais requereram CIMs = 0,5 µg/mL. As demais, 29 (85,3%) requereram CIM ≥ 1 µg/mL para inibição, evidenciando resistência ao itraconazol. No GR o aumento das CIMs ao itraconazol aumentou a MG em 10,2 vezes, a CIM₅₀ em 2 vezes e CIM₉₀ em 2 vezes.

5.2.6 Suscetibilidade *in vitro* ao voriconazol

Os testes de suscetibilidade frente ao voriconazol no GS expressou variações de CIMs entre 0,06 a 4 µg/mL, CIM₅₀ = 0,5 µg/mL, CIM₉₀ = 2 µg/mL e média geométrica igual a 0,39 µg/mL. No GS foram detectados oito (23,53 %) isolados com CIM entre 1 e 2 µg/mL (sensíveis dose-dependente) e um (2,94%) com CIM = 4 µg/mL (resistente) frente ao voriconazol. Após a indução da resistência (GR) a faixa de suscetibilidade variou de 1 a 128 µg/mL; CIM₅₀ = 8 µg/mL; CIM₉₀ = 16 µg/mL e média geométrica igual a 6,52 µg/mL. No GR não foi evidenciado nenhum isolado sensível ao voriconazol sendo os isolados classificados em: oito (23,53 %) sensíveis dose-dependentes e 26 (76,47%) isolados

resistentes. No GR, o aumento das CIMs ao voriconazol aumentou a MG em 16,7 vezes, a CIM₅₀ em 16 vezes e CIM₉₀ em 8 vezes.

5.3 Avaliação das associações de antifúngicos frente a *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol

Foram estudadas as seguintes combinações: [Anfotericina B + Caspofungina], [Anfotericina B + Cetoconazol], [Anfotericina B + Flucitosina], [Anfotericina B + Itraconazol], [Anfotericina B + Voriconazol], [Flucitosina + Caspofungina], [Flucitosina + Cetoconazol], [Flucitosina + Itraconazol], [Voriconazol + Caspofungina], [Voriconazol + Flucitosina] e [Voriconazol + Itraconazol]. Para cada associação foram calculados as concentrações inibitórias fracionárias (CIFs) e os índices das concentrações inibitórias fracionárias (ICIFs) de todos isolados para cada associação. Os resultados das interações das associações frente aos isolados sensíveis e resistentes estão dispostas na Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5. Também foram calculados os percentuais de interações para cada associação, estes encontram-se apresentados na Tabela 6.

5.3.1 Atividade *in vitro* de combinação de anfotericina B e antifúngicos

As combinações de anfotericina B com itraconazol, voriconazol, caspofungina e cetoconazol apresentaram, de modo geral, efeito indiferente frente aos isolados do GS; porém, quando testadas frente a *C. glabrata* resistentes ao fluconazol (GR) sinergismo foi observado na maioria das combinações. Em menor frequência, foram também observadas interações antagônicas frente a *C. glabrata* fluconazol-resistentes (GR).

A associação de caspofungina com anfotericina B resultou em 5,88% de sinergismo, 79,41% de indiferença e 14,71% de antagonismo frente ao GS. Os percentuais das interações sofreram alterações frente ao GR, onde não houve surgimento de interações do tipo antagônicas, e as sinérgicas revelaram um aumento para 47,06%. As taxas de indiferença ainda foram as mais prevalentes, porém caíram para 52,94% entre os isolados fluconazol-resistentes.

A melhor combinação de triazólicos com poliênico, foi demonstrada na associação de cetoconazol e anfotericina B. Esta associação frente aos isolados sensíveis foi possível observar 26,47% de sinergismo, 67,65% de indiferença e 5,88% apenas de antagonismo. Considerando os isolados do GR, a interação sinérgica desta associação foi capaz de inibir 73,53% dos isolados, as taxas de indiferença caíram para 26,47% e antagonismo reduzida a zero.

Dentre as associações com anfotericina B, os melhores índices de sinergismo foram encontrados na combinação com flucitosina. Foram evidenciados 61,77% e 76,47% de sinergismo nos grupos GS e GR respectivamente. Não foram detectados nenhum isolado com a interação antagônica nesta associação, e indiferença esteve presente em 38,23% no grupo sensível e teve uma redução na taxa para 23,52% nos isolados resistentes ao fluconazol.

Entre todas as combinações, itraconazol com anfotericina B, revelou o maior declínio nas taxas de antagonismo, passando de 35,29% nos isolados sensíveis para apenas 2,94% nos isolados fluconazol-resistentes. Apenas um (2,94%) isolado sensível ao fluconazol foi inibido por interação sinérgica, enquanto que nos isolados resistentes 17 (50%) foram inibidos por esta interação. Indiferença passou de 61,77% para 47,06% nos grupos sensíveis e resistentes ao fluconazol respectivamente.

A combinação do triazólico, voriconazol, com anfotericina B também revelou uma redução na taxa de antagonismo no GR, entre os isolados sensíveis a taxa foi de 29,41%, nos resistentes reduziu-se à zero. Outro dado importante é o aumento de isolados resistentes ao fluconazol inibidos pela combinação sinérgica, onde passaram de 5,88% dos sensíveis ao fluconazol para 55,88% dos resistentes ao fluconazol.

Tabela 3: Interações das combinações de anfotericina B com antifúngicos frente a *C. glabrata* sensíveis (GS) e resistentes (GR) ao fluconazol.

Antifúngicos	Grupos de isolados	MG das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) de		CIF ($\mu\text{g/mL}$) _a	ICIF _b	Resultado
		cada antifúngico				
		Sem combinação	Na combinação			
Caspofungina Anfotericina B	GS	0,110	0,130	1,18	1,65	Indiferença
		0,091	0,043	0,47		
Anfotericina B	GR	0,207	0,135	0,65	0,71	Sinergismo
		0,783	0,046	0,06		
Cetoconazol Anfotericina B	GS	0,903	0,499	0,55	0,98	Indiferença
		0,091	0,039	0,43		
Anfotericina B	GR	4,708	1,000	0,21	0,33	Sinergismo
		0,783	0,091	0,12		
Flucitosina Anfotericina B	GS	0,030	0,007	0,23	0,50	Sinergismo
		0,094	0,027	0,27		
Anfotericina B	GR	0,035	0,011	0,31	0,35	Sinergismo
		0,783	0,031	0,04		
Itraconazol Anfotericina B	GS	0,221	0,415	1,87	2,51	Indiferença
		0,091	0,059	0,65		
Anfotericina B	GR	2,260	1,063	0,47	0,56	Indiferença
		0,783	0,072	0,09		
Voriconazol Anfotericina B	GS	0,391	0,470	1,20	1,90	Indiferença
		0,091	0,064	0,70		
Anfotericina B	GR	6,524	3,468	0,53	0,60	Indiferença
		0,783	0,058	0,07		

a Divisão da média geométrica das CIMs do antifúngico na combinação pela CIM do antifúngico sozinho.

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

5.3.2 Atividade *in vitro* de combinação de flucitosina e antifúngicos

Em relação às combinações de flucitosina com os antifúngicos (caspofungina, cetoconazol e itraconazol) foram observadas elevadas taxas de atividade indiferente frente aos isolados de sensíveis e resistentes de *Candida glabrata*. Por outro lado foram detectadas

elevações nas taxas de sinergismo na maioria das combinações quando testados com o grupo fluconazol-resistentes. Antagonismo esteve presente em algumas associações com flucitosina, entretanto houve redução nos percentuais e até mesmo o desaparecimento desta interação frente aos isolados resistentes ao fluconazol.

Considerando os resultados da associação de flucitosina com o antifúngico da classe das equinocandinas, a caspofungina, os isolados do grupo sensível ao fluconazol apresentaram pequeno índice de antagonismo (2,94%) que caiu para zero nos isolados resistentes ao fluconazol. A indiferença foi encontrada em maior percentual nos dois grupos (GS e GR) nesta associação, 67,65% no GS, entretanto apresentaram uma redução para 52,94% no GR. O Sinergismo esteve presente em 29,41% no GS, e obtve um crescimento para 47,06% no GR, na combinação de flucitosina e caspofungina.

Na combinação dos antifúngicos, flucitosina e cetoconazol, a diferença nos percentuais de interações não foram significativas entre os grupos GS e GR. Entretando, esta associação teve como predomínio o antagonismo com 61,77% no isolados sensíveis e 55,88% no resistentes. Permaneceram constantes os percentuais de sinergismo com 2,94% nos isolados sensíveis e resistentes ao fluconazol.

A associação de itraconazol frente aos isolados sensíveis ao fluconazol revelaram a presença de todas as interações porém a que mais prevaleceu foi indiferença com 58,83%, seguida de antagonismo com 23,53% e sinergismo com 17,64%. As taxas de interações sofreram alterações quando esta associação foi testada frente ao grupo resistente, a indiferença continuou prevalecendo, porém a taxa de sinergismo cresceu para 47,06% e antagonismo sofreu uma redução para 2,94% apenas.

Tabela 4: Interações das combinações de flucitosina com antifúngicos frente a *C. glabrata* sensíveis (GS) e resistentes (GR) ao fluconazol.

Antifúngicos	Grupos de isolados	MG das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) de		CIF ($\mu\text{g/mL}$) _a	ICIF _b	Resultado
		cada antifúngico				
		Sem combinação	Na combinação			
Caspofungina	GS	0,122	0,059	0,48	0,78	Indiferença
		0,030	0,009	0,30		
Flucitosina	GR	0,208	0,079	0,37	0,77	Indiferença
		0,030	0,012	0,40		
Cetoconazol	GS	0,884	2,452	2,77	4,00	Antagonismo
		0,030	0,036	1,23		
Flucitosina	GR	4,708	10,217	2,17	3,26	Indiferença
		0,030	0,034	1,09		
Itraconazol	GS	0,234	0,239	1,02	1,45	Indiferença
		0,030	0,013	0,43		
Flucitosina	GR	2,260	0,692	0,31	0,61	Indiferença
		0,030	0,009	0,30		

a Divisão da média geométrica das CIMs do antifúngico na combinação pela CIM do antifúngico sozinho.

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

5.3.3 Atividade *in vitro* de combinação de voriconazol e antifúngicos

Os testes da associação do azólico, voriconazol com flucitosina, revelaram poucas alterações nos percentuais de indiferença em ambos os grupos, GS (52,94%) e GR (55,88%). Foram observados 29,94% de sinergismo e 17,72% de antagonismo nos isolados sensíveis ao fluconazol, por outro lado quando foram analisados os testes com o GR, os percentuais de antagonismo caíram para zero e os de sinergismo cresceram para 44,12% na combinação de voriconazol e flucitosina.

Em relação às combinações de voriconazol com os antifúngicos: itraconazol e caspofungina foram observadas elevadas taxas de atividade indiferente frente a ambos os grupos de isolados. Por outro lado, os isolados sensíveis ao fluconazol não apresentaram taxas

de sinergismo para estas associações e os isolados resistentes não demonstraram percentuais de antagonismo para as associações com voriconazol.

A combinação de itraconazol e voriconazol resultou em 76,47% de indiferença, 23,53% de antagonismo e nenhuma interação do tipo sinérgica frente ao GS. Entretanto, esta associação quando testada com o GR revelou que 55,88% foram inibidos pela interação sinérgica, 44,12% apresentaram indiferença e nenhum isolado apresentou antagonismo.

A associação de voriconazol com o antifúngico da classe das equinocandina, a caspofungina, apresentou resultados semelhantes a da associação com o azólico, itraconazol. Porém com percentuais mais altos de indiferença nos dois grupos GS (85,29%) e GR (70,59%). Sinergismo somente foi detectada no grupo fluconazol-resistentes com 29,41% e antagonismo apresentou apenas 14,71% nos isolados sensíveis ao fluconazol.

Tabela 5: Interações das combinações de voriconazol com antifúngicos frente a *C. glabrata* sensíveis (GS) e resistentes (GR) ao fluconazol.

Antifúngicos	Grupos de isolados	MG das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) de		CIF ($\mu\text{g/mL}$) _a	ICIF _b	Resultado
		cada antifúngico				
		Sem combinação	Na combinação			
Flucitosina	GS	0,030	0,013	0,43	1,29	Indiferença
		0,407	0,353	0,86		
Voriconazol	GR	0,030	0,013	0,43	0,78	Indiferença
		6,524	2,306	0,35		
Itraconazol	GS	0,221	0,235	1,06	1,79	Indiferença
		0,391	0,288	0,73		
Voriconazol	GR	2,260	0,553	0,24	0,37	Sinergismo
		6,524	0,884	0,13		
Caspofungina	GS	0,110	0,124	1,27	2,04	Indiferença
		0,391	0,300	0,77		
Voriconazol	GR	0,208	0,150	0,72	0,85	Indiferença
		6,524	0,849	0,13		

a Divisão da média geométrica das CIMs do antifúngico na combinação pela CIM do antifúngico sozinho.

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

Tabela 6: Percentuais de sinergismo, indiferença e antagonismo resultantes das combinações de flucitosina, anfotericina, voriconazol, itraconazol, cetoconazol e caspofungina frente a *Candida glabrata* sensíveis (GS) e resistentes (GR) ao fluconazol.

Antifúngicos	Grupos de isolados	Interações (%)		
		Sinergismo	Indiferença	Antagonismo
Itraconazol	GS	2,94	61,77	35,29
Anfotericina B	GR	50	47,06	2,94
Voriconazol	GS	5,88	64,71	29,41
Anfotericina B	GR	55,88	44,12	0
Caspofungina	GS	5,88	79,41	14,71
Anfotericina B	GR	47,06	52,94	0
Cetoconazol	GS	26,47	67,65	5,88
Anfotericina B	GR	73,53	26,47	0
Anfotericina B	GS	61,77	38,23	0
Flucitosina	GR	76,47	23,53	0
Itraconazol	GS	17,64	58,83	23,53
Flucitosina	GR	47,06	50,00	2,94
Voriconazol	GS	29,94	52,94	17,72
Flucitosina	GR	44,12	55,88	0
Caspofungina	GS	29,41	67,65	2,94
Flucitosina	GR	47,06	52,94	0
Cetoconazol	GS	2,94	35,29	61,77
Flucitosina	GR	2,94	41,18	55,88
Itraconazol	GS	0	76,47	23,53
Voriconazol	GR	55,88	44,12	0
Caspofungina	GS	0	85,29	14,71
Voriconazol	GR	29,41	70,59	0

6 DISCUSSÃO

Durante as décadas de 1980 e 1990 ocorreram um crescimento marcante da população imunocomprometida, particularmente, devido o aumento do uso de agentes imunossupressivos, quimioterapias e pacientes infectados com HIV. Em detrimento das doenças que resultam comprometimento imunológico, houve um elevação no casos de infecções fúngicas oportunistas, tanto superficiais quanto sistêmicas (KAO et al, 1999; TRICK et al, 2002). O gênero *Candida*, atualmente, ocupa a quarta posição dentre as causas de infecções sanguíneas nos EUA, acomete 8% a 10% dos pacientes com infecções sanguíneas em ambientes hospitalares. As altas taxas de mortalidade, de até 49%, são as maiores preocupações com as candidíases invasivas (WEY et al, 1988; ZAOUTIS et al, 2005). *Candida glabrata* encontra-se em segundo lugar de isolamento depois de *C. albicans* em candidemias, acomete 20 a 24% de pacientes com infecções sanguíneas causadas por *Candida* spp nos EUA (LYON et al, 2010). Trick et al (2003) demonstrou que dentre as espécies de *Candida*, as infecções por *C. glabrata* tem se tornado frequente em infecções sanguíneas em UTIs desde 1993. Em escala global, a frequência de candidemias por *C. glabrata* varia de 22% na América do Norte para 4 a 6% na América Latina (PFALLER et al, 2004b; PFALLER et al, 2004c), 8,8% a 10,58% na Europa e 7,2% a 12,1% na região da Ásia (PFALLER et al, 2003b; PFALLER et al, 2005). Alguns estudos revelam taxas ainda maiores, Ruan et al (2007) demonstra que *C. glabrata* é foi responsável por 30% dos episódios de candidemias no período de 2000 e 2005. No mesmo estudo a incidência de fungemia por *C. glabrata* foi de 1.3/1000 em pacientes internados em UTIs. No Brasil a incidência desta espécie é menor, se comparado com outros países, Colombo et al (2006) relatam que *C. glabrata* ocupa o 5º lugar (4,9%) entre os agentes causadores de candidemias. Acredita-se que a prevalência desta espécie é em decorrência de diferentes fatores, incluindo características geográficas (PFALLER et al, 2004a; PFALLER et al, 2004d; PFALLER et al, 2005) idade dos pacientes (DIEKEMA et al, 2002; MALANI et al, 2005) características da população dos pacientes estudadas (ABI-SAID et al, 1997) e o frequente uso de fluconazol como tratamento ou profilaxia (MARR et al 2000; ANTONIADOU et al 2003).

A *Infectious Diseases Society of America* recentemente atualizou as orientações para o tratamento de candidemias e infecções invasivas por *Candida* (PAPPAS et al, 2009). As normas para o tratamento de infecções invasivas por *Candida* depende dos fatores como: estado do paciente, espécie de *Candida* isolada, padrões de suscetibilidade do isolado, exposição primária do paciente a antifúngicos, e o órgão envolvido pela infecção (MORRELL et al, 2005; GAREY et al 2006). Fluconazol permanece a terapia de seleção em pacientes que não tiveram histórico de exposição a azólicos, com o curso da doença de leve a moderada, e que não possuam riscos de infecção por *C. glabrata* (pacientes idosos, neoplásicos ou diabéticos) (REX et al, 1994; PAPPAS et al, 2009; KULLBERG et al 2005). No entanto, o fluconazol não é administrado como terapia primária em pacientes neutropênicos, com doenças severas, e em casos de miocardites, endocardites e meningites. Embora itraconazol possua o espectro de ação maior que o de fluconazol, o seu uso está limitado no tratamento de infecções invasivas, devido suas propriedades farmacocinéticas (PAPPAS et al, 2009). Voriconazol possui boa atividade contra a maioria das espécies de *Candida*, é uma alternativa oral e intravenosa à anfotericina B e as equinocandinas, entretando não é indicado para terapia primária em infecções disseminadas por *C. glabrata* e *C. krusei* e isolados resistentes ao fluconazol (PFALLER et al, 2002b). As equinocandinas tem se tornado a classe de escolha para terapia primária, de comprovada ou suspeita, de candidíases invasivas. A facilidade de administração, baixa toxicidade, poucas interações farmacológicas e ampla atividade contra maioria das espécies de *Candida* spp, comprovam sua utilização. Além do mais, as equinocandinas são indicadas como primeira linha no tratamento de pacientes que possuem histórico de exposição aos azólicos, neutropenia, alterações hemodinâmicas, alergias aos componentes dos azólicos ou anfotericina B, ou infecções por *C. krusei* ou *C. glabrata* (KUSE et al, 2007). Apesar da sua conhecida toxicidade, a anfotericina B ainda é largamente utilizada no tratamento de candidemias. Entretanto, são recomendadas as formulações lipídicas no tratamento de infecções invasivas, em circunstâncias de intolerância das equinocandinas ou azólicos, infecções resistentes ou refratárias a outros antifúngicos, ou suspeitas de infecções por fungos não-*Candida* como *Cryptococcus neoformans* (MORA-DUARTE et al, 2002; REX et al, 2003; KUSE et al, 2007). A profilaxia com antifúngicos azólicos em pacientes severamente doentes, transplantados ou que realizaram quimioterapia reduziu drasticamente a taxa mortalidade por infecções fúngicas (WINSTON et al, 1999). Porém, esta prática não previne infecções por espécies como *C. krusei* e *C. glabrata*. Estudos

clínicos têm mostrado que a frequência de colonização e infecção de pacientes com *C. glabrata* podem ser aumentadas em populações submetidas à profilaxia com fluconazol (HUSAIN et al, 2003; BENNETT et al, 2004; MANN et al, 2009). As infecções disseminadas de *Candida* também podem ser tratadas com alternativas terapêuticas, dentre elas estão as associações de antifúngicos. Entretanto, o tratamento combinado com dois ou mais antifúngicos ou fármacos de outras classes (antibacterianos, estatinas ou anti-inflamatórios), requerem estudos específicos, pois há possibilidade de ocorrer interações indesejadas entre as drogas envolvidas (MUKHERJEE et al, 2005). A associação de anfotericina B e 5-fluorocitosina na grande maioria resulta em sinergismo e atualmente é utilizada na terapia inicial da criptococose, e em certos casos de candidíase e aspergilose. O mesmo efeito foi evidenciado para fluconazol e 5-fluorocitosina na criptococose e candidíase. Porém, a combinação de anfotericina B e antifúngicos azólicos podem resultar em eficácia reduzida quando comparados com utilização das drogas em uso isolado, ou simplesmente, em ausência de sinergismo (POLAK et al, 1987). A imunoterapia também tem sido utilizada como adjuvante no tratamento antifúngico, incluindo o uso de imunomoduladores, como G-CSF, GM-CSF e α -interferon. A utilização de anticorpos monoclonais demonstram prevenir candidíases disseminadas em estudos utilizando ratos, e vem sendo foco de estudos para a produção de vacinas contra candidíases (POYNTON et al, 1998).

As principais falhas da terapêutica antifúngica podem ser o resultado de: a) doses inadequadas; b) absorção, distribuição ou metabolismo deficiente; c) interações medicamentosas; d) neutropenia grave; e) presença de corpo estranho; e) emergência do fenômeno da resistência aos antifúngicos (BOFF et al, 2008). Outras causas de falha no tratamento são os fatores locais que interferem na ação do antifúngico, por exemplo: região purulenta onde encontra-se a infecção, e formação de biofilme pelo microrganismo. Depressão severa do sistema imunológico do paciente, pode ser responsável pelo fracasso terapêutico, pois para erradicação da infecção também é necessário bom funcionamento dos leucócitos, polimorfonucleares e células mediadoras de imunidade (REX et al, 2001).

A suscetibilidade *in vitro* é um dos fatores que influencia o resultado da terapia de infecções fúngicas (REX et al, 2001). É determinado pela concentração inibitória mínima (CIM), que representa a mínima concentração da droga capaz de inibir 80% (ou 50% em alguns casos) o crescimento fúngico relativo na ausência da droga. A técnica mais utilizada para determinação da CIM é o método de microdiluição em caldo. Em relação a fungos

leveduriformes, como *Candida*, o protocolo utilizado para determinação da CIM é o M27-A3, atualizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) em 2008. A *Infection Society of América* recomenda que todos os primeiros isolamentos de infecções de corrente sanguíneas sejam identificados em nível de espécie e realizados testes de suscetibilidade (KAO et al, 1999; TRICK et al, 2002). A resistência aos antifúngicos tem representado um grande desafio para a clínica, frente às dificuldades observadas no tratamento de candidíases. As infecções por *C. glabrata* são especialmente importantes devido esta espécie apresentar uma resistência inata a agentes antifúngicos do tipo azóis e uma baixa suscetibilidade a anfotericina B (DENNING et al, 1997; SANGUINETTI et al, 2005). Em infecções sanguíneas por *C. glabrata*, resistência ao fluconazol é presente em aproximadamente 10% a 15% dos casos (PFALLER et al, 2002b). No entanto, há relato que a pressão seletiva da droga não é a única força responsável pela atual prevalência de *C. glabrata* em candidemias, a exposição desta espécie a sub-doses de fluconazol pode resultar também em uma resistência adquirida. (PFALLER & DIEKEMA, 2004a).

No presente estudo foram evidenciadas as CIMs de seis diferentes antifúngicos frente a isolados de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol, a fim de detectar diferenças nas CIMs requeridas entre os dois grupos de isolados (GS e GR). No GS 24% dos isolados requerem CIMs de 16 a 32 µg/mL, sendo estes classificados como sensíveis dose dependentes (SDD) ao fluconazol, e nenhum isolado resistente a este antifúngico foi evidenciado. Ainda no GS, foram evidenciados 11,7% isolados resistentes ao itraconazol. Isolados SDD estiveram presentes em 23,53 % dos isolados do GS frente ao voriconazol e apenas um isolado (2,94%) apresentou resistência ao voriconazol. Estes fatos podem ser explicados por consequência de tratar-se de isolados de *C. glabrata*, dos quais são naturalmente menos susceptíveis aos azólicos (CUENCA-ESTRELLA et al, 1999; DRAGO et al, 2004; KUCHARÍCOVÁ et al, 2010). Blanco et al (2009) evidenciaram um percentual de resistência ao itraconazol semelhante ao do presente estudo no GS, onde em um grupo de 48 isolados de *C. glabrata* 12% apresentaram resistência ao itraconazol. Já Lyon et al (2010) e Drago et al (2004) demonstraram percentuais de resistência ao voriconazol em *C. glabrata* de 2,1% e 5,5% respectivamente, resultados que podem ser comparados com o achado pelo estudo em questão. Avaliando as CIMs dos isolados resistentes ao fluconazol (GR), os resultados demonstraram a ocorrência de resistência cruzada entre anfotericina B (20,58%), caspofungina (2,7%), cetoconazol (14,7%), itraconazol (85,3%) e voriconazol (76,47%).

Considerando os mecanismos de resistência, é esperado encontrar resistência cruzada quando são realizados testes de suscetibilidade aos antifúngicos em isolados resistentes ao fluconazol (QUINDÓS et al, 2000; ALVES et al, 2006). Os maiores percentuais de resistência cruzada foram evidenciados entre os azólicos: itraconazol, voriconazol e cetoconazol, diversos trabalhos relatam resistências cruzadas entre azólicos em isolados clínicos de *C. glabrata* (NGUYEN, YU, 1998; CUENCA-ESTRELLA et al, 1999; DRAGO et al, 2004; BERILA et al, 2009; LYON et al, 2010; KUCHARIKOVA et al, 2010). Bruder-Nascimento et al (2010) no Brasil, avaliaram a suscetibilidade de 25 isolados clínicos de *C. glabrata*, e evidenciaram 68% de resistência ao fluconazol e 88% ao itraconazol, os autores ainda avaliaram a suscetibilidade de anfotericina B, porém não foi relatado resistência. Outro estudo demonstrou a elevada capacidade de *C. glabrata* adquirir resistência ao itraconazol, foram testadas 78 amostras, dentre estas, 83,3% apresentaram resistência ao itraconazol, e em contrapartida foram evidenciadas apenas 5,1% de resistência em fluconazol e 1,3% em voriconazol. Cuenca-Estrella et al (1999) comparando as suscetibilidades de isolados clínicos de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol frente aos azólicos, relataram que os isolados resistentes ao fluconazol requereram uma escala de CIMs para itraconazol (0,5 - ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$) semelhante a do presente estudo (CIM 0,5 -16 $\mu\text{g/mL}$). Os percentuais de resistência ao voriconazol que mais se aproximaram do presente estudo foram os demonstrados por Berilla et al (2009), onde em 38 amostras clínicas *C. glabrata* evidenciaram 28,9% de resistência ao fluconazol, 64,4% ao itraconazol e 42,1% ao voriconazol. Ainda, os autores citam que todos os isolados resistentes ao fluconazol foram também resistentes ao voriconazol e itraconazol. Posteraro et al (2006a) relataram, em um estudo de caso, a aquisição de resistência cruzada a múltiplos antifúngicos no tratamento de candidemia. Uma paciente que apresentava um quadro de candidemia por *C. glabrata*, foi tratada com fluconazol, pois se tratava de uma amostra sanguínea sensível aos azólicos: fluconazol, cetoconazol, itraconazol e voriconazol. No entanto, após seis meses a paciente retornou com quadro de candidemia grave, quando testada novamente a amostra sanguínea de *C. glabrata* o perfil de suscetibilidade foi de: CIM = 256 $\mu\text{g/mL}$ para fluconazol; CIM > 16 $\mu\text{g/mL}$ para cetoconazol; CIM = 4 $\mu\text{g/mL}$ para itraconazol; e CIM = 8 $\mu\text{g/mL}$ para voriconazol. A resistência cruzada entre fluconazol e anfotericina B foi evidenciada por Lyon et al (2010), onde foram testadas as suscetibilidades de 87 isolados de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol, e estas requereram uma variação de CIMs de 0,5 a 8 $\mu\text{g/mL}$, CIM₅₀ = 1 $\mu\text{g/mL}$ e CIM₉₀ = 2 $\mu\text{g/mL}$ para

anfotericina B, parâmetros estes semelhantes aos do presente estudo. Embora caspofungina seja indicada no tratamento de infecções fúngicas causadas por isolados resistentes aos azólicos (POSTERARO et al, 2006b; PAPPAS et al, 2009), no presente estudo um isolado (2,7%) do grupo GR apresentou resistência cruzada com caspofungina. Lyon et al (2010), também evidenciou um baixo percentual de resistência cruzada entre estes antifúngicos frente a isolados clínicos resistentes ao fluconazol (1,1%). Posteraro et al (2006b) ainda evidenciou que a diferença das CIMs em isolados de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol podem contribuir no aumento da CIM para caspofungina.

O presente estudo avaliou interações de associações de antifúngicos frente a *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol, leva-se em consideração que os estudos que utilizaram esta espécie em combinações são limitados. Quando trata-se de isolados resistentes ao fluconazol somente White et al (1998) e Baltch et al (2008) testaram combinações de antifúngicos frente a isolados de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol. Portanto, este estudo é inédito para a grande maioria das associações.

Entre todas as associações os melhores resultados foram evidenciados na combinação de anfotericina B com flucitosina, considerando os altos percentuais de sinergismos nos grupos GS (61,77%) e GR (76,44%), e a ausência de antagonismo entre os grupos GS e GR. A eficácia desta combinação contra fungos oportunistas especialmente em *Cryptococcus neoformans*, é evidenciada desde 1973 por Block & Bennett, e atualmente é utilizada no tratamento de meningites criptocócicas. A interação positiva entre anfotericina B e flucitosina frente a *C. glabrata*, foi relatada por Siau e Kerridge em 1998, onde revelou 100% de sinergismo em isolados resistentes a flucitosina com média de ICIF = 0,5. Montgomerie e Edwards (1975) testou *in vitro* a mesma combinação em isolados de *Candida* spp e também evidenciaram percentuais elevados de sinergismo (88%). Ainda, White et al (2001) relataram em estudo de caso o sucesso no tratamento clínico com a associação de anfotericina B e flucitosina em formulação tópica, em três pacientes com infecções vaginais por *C. glabrata* (dois resistentes a itraconazol e fluconazol e um sensível, porém refratário aos azólicos). Lewis et al (2002) quando comparou a associação frente a um isolado de *C. glabrata* que sofreu pré-exposição ao fluconazol, não evidenciou diferenças significativas nos resultados com ICIF = 0,27 antes da exposição e ICIF = 0,26 depois da exposição nos testes de checkerboard e ICIF = 2 antes e depois da pré-exposição ao fluconazol no Etest. Em contrapartida, quando a associação foi testada em isolados de *C. albicans*, foi evidenciado

indiferença com baixas concentrações de anfotericina B (0,062 µg/mL) e antagonismo quando a concentração de anfotericina B era aumentada (0,5 a 1,5 µg/mL) (GHANNOUM et al, 1995). O mecanismo sinérgico dessa interação parece estar relacionado ao envolvimento no aumento da captação de flucitosina pelas células fúngicas, em decorrência da lesão da membrana plasmática do fungo induzida pela anfotericina B (JOHNSON et al, 2004).

No presente estudo a combinação de anfotericina B e itraconazol revelou um aumento de sinergismo entre os isolados do grupo GR, de 2,94% no GS para 50% no GR, e uma redução de 35,29% no GS para apenas 2,94% de antagonismo. No entanto, no GS a interação mais prevalente foi indiferença, com 61,77%, no GR houve uma pequena redução para 47,06%. Apenas, Petron e Rogers em 1991 testaram esta combinação frente a isolados de *C. glabrata*. Os autores evidenciaram indiferença entre 5 isolados de *C. glabrata* testados frente a associação de itraconazol e anfotericina B. Resultados semelhantes aos encontrados no GS frente a associação de itraconazol e anfotericina B foi evidenciado por Barchiesi et al (2000) em isolados de *Cryptococcus neoformans* com 7% de sinergismo, porém diferente do presente estudo, não foi detectado antagonismo. Li et al (2010) também evidenciaram um percentual reduzido de sinergismo entre isolados de *Tricosporon asahii* com 11%. Antagonismo, na combinação de itraconazol e anfotericina B, foi evidenciado por Scheven e Schwegler (1995) e Sugar e Liu (1998) em isolados de *C. albicans* através das técnicas de disco difusão e infecção *in vivo*, respectivamente. Em relação a associação de voriconazol e anfotericina B, os percentuais de sinergismo do grupo GS (5,88%) foram semelhantes aos encontrados por Barchiesi et al (2004) (10%) em isolados clínicos de *C. glabrata* e por Oz et al (2008) (6,6%) em isolados de *C. albicans*. Estes estudos não evidenciaram antagonismo e no presente estudo foi observado 29,41% no GS. Entretanto, no GR o percentual de antagonismo caiu para zero, e a sinergismo sofreu um aumento de quase 10 vezes (55,88%). Atualmente, Silva et al (2010) relataram que a combinação de voriconazol e anfotericina B foi mais eficaz no tratamento de ratos infectados com isolados resistentes ao fluconazol de *Cryptococcus neoformans*, do que o tratamento de voriconazol ou anfotericina B isoladamente. A combinação do azólico, cetoconazol, com anfotericina B resultou em 26,46% de sinergismo e apenas 5,88% de antagonismo no GS, no entanto a interação evidenciou ser mais eficaz entre os isolados do GR com 73,53% de sinergismo e ausência de antagonismo. Somente Odds em 1982 evidenciou sinergismo entre isolados de *Candida* spp frente a esta combinação, com 37,5% (2/7) de sinergismo e não houve presença de antagonismo. Embora o presente estudo tenha

demonstrado baixas taxas de antagonismo nos grupos GS e ausência no GR, Petron e Rogers (1991) identificaram antagonismo em seu estudo, pois ao testar a combinação frente a isolados de *C. glabrata* a média geométrica encontrada foi de ICIF = 4. Maesaki et al (1994) também evidenciou presença significativa de antagonismo (34%) na combinação de cetoconazol e anfotericina B em isolados de *Aspergillus fumigatus*. A questão da associação entre poliênicos e azólicos é controversa. Fluconazol e voriconazol, por serem drogas hidrossolúveis não permanecem nas membranas fúngicas, assim a anfotericina B pode atuar com adjuvante na ultrapassagem do azólico para o interior do fungo, por isso a combinação tende a ser menos antagônica. Já os lipossolúveis como posaconazol, ruvoconazol, itraconazol e cetoconazol podem se concentrar nas membranas e antagonizar o efeito da anfotericina B, no entanto os dados clínicos são esparsos (JOHNSON et al, 2004). Em relação aos isolados expostos ao fluconazol, Petron e Rogers (1988) reportam que uma curta pre-exposição a anfotericina B posteriormente pode reduzir a atividade de azólicos, porém a pré-exposição aos azólicos não altera a eficácia da anfotericina B.

A combinação de caspofungina e anfotericina B, no presente estudo, resultou em altos percentuais de indiferença com 79,41% no GS e 52,94% no GR. Semelhante aos resultados do presente estudo, Barchiesi et al (2005) utilizando 2 isolados de *C. glabrata* evidenciaram indiferença na técnica de checkerboard e excluíram a possibilidade de antagonismo através da técnica de curva de morte. Tobidic et al (2010) detectou 100% de indiferença em isolados de *C. albicans*. Embora os testes *in vitro* apresentem indiferença, Hossain et al (2003) ao testar a associação de caspofungina e anfotericina B frente a *C. albicans* resistente ao fluconazol, demonstraram que os testes *in vivo* podem resultar em sinergismo. Neste estudo os autores revelaram que sobrevida dos ratos tratados com a associação foi aumentada quando comparada com o tratamento de anfotericina B isoladamente. No presente estudo, as taxas de sinergismos no GR foram de 47,06% e as de antagonismos foram nulas. Kiraz et al (2009) ao testar 50 amostras de *C. glabrata* (no estudo não foram realizados testes de suscetibilidade ao fluconazol) frente a combinação de caspofungina e anfotericina B, evidenciaram sinergismo em: 46% no teste de curva de morte; 40% no Etest1; 16% no Etest2; e em disco difusão evidenciaram um halo de inibição superior aos produzidos pelos antifúngicos separadamente. Ainda, Franzot e Casadevall (1997) ao testar a interação de caspofungina e anfotericina B frente a isolados resistentes ao fluconazol de *Cryptococcus neoformans*, evidenciaram 100% de sinergismo.

O presente estudo foi o primeiro a testar de flucitosina e itraconazol combinados frente a isolados de *C. glabrata*. Embora os altos percentuais de indiferença (58,83% no GS e 50% no GR), houve um aumento de sinergismo de 17,64% no GS para 47,06% no GR. Ao testar esta mesma associação *in vitro*, Barchiesi et al (1999) frente a *Cryptococcus neoformans* e Schwarz et al (2003) frente a *Aspergillus* spp, evidenciaram 63% e 60% de sinergismo, respectivamente. Testes *in vivo* revelaram que a combinação revelou interação sinérgica e aditiva contra isolados de *C. albicans* e *Aspergillus* spp, entretanto em isolados de *Cryptococcus neoformans* foi definida como indiferente (POLAK et al, 1987). Ainda, Barbaro et al (1996) testaram a eficácia do tratamento da associação de flucitosina e itraconazol em comparação com fluconazol + placebo. Os autores do estudos revelaram que a associação obteve 97,3% de cura em pacientes HIV com candidíase esofágica, em relação a 94,8% de fluconazol + placebo. Os testes realizados com a associação do imidazólico, cetoconazol e flucitosina, também foram inéditos frente a isolados de *C. glabrata*. Tanto no GS quanto no GR, antagonismo foi a interação mais prevalente nesta associação (61,77% no GS e 55,88% no GR). Sinergismo permaneceu constante com apenas 2,94% no GS e GR. Indiferença também foi observado por Polak et al (1982) através de técnicas *in vivo* frente a isolados sensíveis, intermediários e resistentes a flucitosina de *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* e *C. albicans*. Os autores identificaram indiferença nos 3 modelos de infecções (sensíveis, intermediários e resistentes a flucitosina) de candidíase, criptococose e aspergilose. Odds (1982) através de testes *in vitro*, relataram que de 7 isolados de *Candida* spp, um (14,28%) apresentava-se sinérgico e um (14,28%) antagônico a associação de cetoconazol e flucitosina. Diferente ao relatado no presente estudo, Hugues et al (1986) demonstrou que a combinação de itraconazol e flucitosina possui atividade sinérgica. Os testes foram realizados frente a infecções de pele causada por *Candida* spp em coelhos neutropênicos. O mecanismo proposto de interação sinérgica entre azólicos e flucitosina é a partir de que, os azólicos ocasionam danos na membrana celular fúngica, e logo facilitam a entrada de flucitosina ao interior da célula fúngica (BARCHIESI et al, 1999; JOHNSON et al 2004).

A interação de flucitosina associada a caspofungina, no presente estudo, resultou em altas taxas de indiferença em ambos os grupos (67,65% no GS e 52,94% no GR). No entanto, foi evidenciado apenas um isolado (2,94%) do GS antagônico e nenhum isolado no GR. Sinergismo esteve presente em 29,41% no GS e 47,06% no GR. Estudo *in vitro* avaliando a interação da associação de caspofungina e flucitosina frente a *C. glabrata*, nunca havia sido

realizado, até o presente estudo. Apenas, Dumainn et al (2008) reportou sinergismo na utilização de caspofungina mais flucitosina para o tratamento clínico de um paciente com infecção de prótese no joelho causada por *C. glabrata*. Avaliando a interação desta associação frente a *Aspergillus* spp Shwarz et al (2003), Dannaoui et al (2003) e Dannaoui et al (2004) evidenciaram altos percentuais de sinergismo: 63%, 92% e 62% respectivamente. Os autores destes estudos não evidenciaram interação do tipo antagônica em seus trabalhos.

No presente estudo, a combinação de voriconazol com flucitosina resultou em 29,92% de sinergismo e 17,72% de antagonismo no GS. Ghannoum e Isham (2003) através de testes *in vitro* evidenciaram em isolados de *C. glabrata*, 50% de sinergismo e 50% de antagonismo. Barchiesi et al (2004) também avaliaram a combinação de flucitosina e voriconazol frente a isolados de *C. glabrata*, porém os autores relataram 5% de sinergismo e nenhuma taxa de antagonismo nos testes de chequerboard, e na técnica de curva de morte foi identificado interação do tipo indiferente. Frente aos isolados do grupo GR no presente estudo, as taxas de sinergismos aumentaram para 44,12% e de antagonismo reduziram-se a zero. Ghannaum e Isham (2003) relataram percentuais semelhantes aos do estudo em questão, entretanto o fungo utilizado foi *Aspergillus* spp, com 40% de sinergismo e ausência de antagonismo. Contraditório aos resultados manifestados pelo presente estudo, Dannaoui et al (2003) relatou em seu estudo *in vitro*, 58% de antagonismo e nenhum isolado sinérgico à combinação de flucitosina e voriconazol frente a *Aspergillus* spp. A combinação de itraconazol e voriconazol frente ao GS, no estudo em questão, resultou ausência da interação sinérgica, entretanto antagonismo foi presente em 23,53% dos isolados. Já no GR sinergismo sofreu um aumento para 55,88% e antagonismo não foi evidenciado em nenhum isolado do GR. A combinação de itraconazol e voriconazol foi testada, pela primeira vez, frente ao gênero *Candida* pelo presente estudo. Somente Garcia-Effron et al em 2005 testaram esta combinação frente a isolados de *Aspergillus* spp sensíveis e resistentes aos azólicos. Neste estudo através do método de chequerboard, os isolados sensíveis evidenciaram 100% de sinergismo, e os resistentes 100% de indiferença. A associação da equinocandina, caspofungina e voriconazol, entre todas as associações envolvidas no presente estudo, evidenciou os maiores percentuais de indiferença entre os ambos grupos (GS e GR). Sinergismo não esteve presente no GS, já antagonismo obteve um percentual de 14,71%. Baltch et al (2008) avaliaram o efeito da associação de voriconazol e caspofungina através de curva de morte em macrófagos humanos (com e sem GM-CSF) infectados por *C. glabrata* resistentes ao fluconazol, e evidenciaram

que a associação possui maior efeito antifúngico quando comparado com a atividade dos antifúngicos isoladamente. As taxas de antagonismo no GR no presente estudo reduziram-se a zero, e as de sinergismo se elevaram-se a 29,41%. Embora Kiraz et al (2010) tenha avaliado a combinação de voriconazol e caspofungina frente a isolados clínicos de *C. glabrata*, os resultados dos testes com o GR, do presente estudo, foram semelhantes aos evidenciados pelos autores. Os autores deste estudo avaliaram a combinação através de 3 técnicas diferentes e identificaram: 16% de sinergismo e 2% de indiferença na curva de morte; 32% de sinergismo e ausência de antagonismo no Etest; e os halos formados pela combinação foram maiores do que no antifúngicos separadamente, nos testes com disco difusão.

6.1 Considerações finais

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

As associações entre antifúngicos têm sido pouco exploradas; mas podem se constituir na única ou melhor escolha terapêutica. Os resultados aqui obtidos apontam que a combinação de antifúngicos foi mais eficaz frente a isolados resistentes do que frente aos isolados sensíveis ao fluconazol. Estes achados, enquanto área de pesquisa, deverão ser melhor explorados, pois, disparidades entre estudos *in vitro* e *in vivo*, bem como controvérsias sobre o efeito sinérgico ou antagônico de algumas associações não permitem, ainda, sua efetiva aplicação nos pacientes acometidos de candidíases, cujos agentes sejam resistentes a determinados antifúngicos.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que:

Foi possível induzir resistência ao fluconazol nos 34 isolados de *C. glabrata*, requerendo CIM \geq 64 $\mu\text{g/mL}$, após a indução.

Dentre os isolados de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol, foi evidenciado resistência aos azólicos, voriconazol e itraconazol.

C. glabrata resistentes ao fluconazol evidenciaram resistência cruzada ao cetoconazol, itraconazol, voriconazol, anfotericina B e caspofungina.

As combinações de antifúngicos frente aos grupos sensíveis e resistentes ao fluconazol resultaram, em sua maior parte, em interações indiferentes.

A combinação que evidenciou melhores percentuais de sinergismo frente aos dois grupos foi anfotericina B + flucitosina (GS = 61,77% e GR = 76,47%) e com ausência de antagonismo.

Frente aos isolados resistentes ao fluconazol (GR) outras combinações sinérgicas foram : anfotericina B + cetoconazol (73,53%), anfotericina B + voriconazol (55,88%), todos com ausência de antagonismo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABETE, J. F. Antifúngicos: azoles, imidazoles, triazoles. **Medicine**, 7(91): 4231-4241,1998.

ABI-SAID, D.; ANAISSIE, E.; UZUN, O.; RAAD, I.; PINZCOWSKI, H.; VARTIVARIAN, S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clin. Infect. Dis.**, 24(6): 1122-8, 1997.

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

ALONSO-VALLE, H.; ACHA, O.; GARCIA-PALOMO, J. D.; FARINAS-ALVAREZ, C.; FERNANDEZ-MAZARRASA, C.; FARINAS, M. C.. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 22:254–257, 2003.

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

ANTONIADOU, A.; TORRES, H. A.; LEWIS, R. E.; THORNB, Y. J.; BODEY, G. P.; TARRAND, J. P.; HAN, X. Y.; ROLSTON, K. V.; SAFDAR, A.; RAAD, I. I.; KONTOYIANNIS, D. P. Candidemia in a tertiary care cancer center: in vitro susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy. **Medicine (Baltimore)**, 82(5): 309-21, 2003.

ARIF, S.; BARKHAM, T.; POWER, E. G.; HOWELL, S. H. Techniques for investigation of an apparent outbreak of infection with *Candida glabrata*. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 2205–2209 (1996).

BADER, M. S.; LAI, S. M.; KUMAR, V.; HINTHORN, D. Candidemia in patients with diabetes mellitus: epidemiology and predictors of mortality. **Scand. J. Infect. Dis.**, 36:860–864, 2004.

BALKIS, M. M.; LEIDICH, S. D.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Mechanisms of fungal resistance: an overview. **Drugs**, 62:1025-1040, 2002.

BALTCH, A. L.; BOPP, L. H.; SMITH, R. P.; RITZ, W. J.; MICHELSEN, P. B. Anti*Candidal* effects of voriconazole and caspofungin, singly and in combination, against *Candida glabrata*, extracellularly and intracellularly in granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)-activated human monocytes. **J. Antimicrob. Chemother.**, 62: 1285–1290, 2008.

BARBARO, G.; BARBARINI, G.; DI LORENZO, G. Fluconazole vs itraconazole-flucytosine association in the treatment of esophageal candidiasis in AIDS patients. A double-blind, multicenter placebo-controlled study. **Chest.**; 110(6):1507-14, 1996.

BARCHIESI, F.; SCHIMIZZI, A. M.; CASELLI, F.; NOVELLI, A.; FALLANI, S.; GIANNINI, D.; ARZENI, D.; DI CESARE, S.; DI FRANCESCO, L. F.; FORTUNA, M.; GIACOMETTI, A.; CARLE, F.; MAZZEI, T.; SCALISE, G. Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, 44(9): 2435-2441, 2000.

BARCHIESI, F.; SPREGHINI, E.; FOTHERGILL, A. W.; ARZENI, D.; GREGANTI, G.; GIANNINI, D.; RINALDI, M. G.; SCALISE, G. Caspofungin in Combination with Amphotericin B against *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49(6): 2546–2549, 2005.

BARCHIESI, F.; SPREGHINI, E.; MARACCI, M.; FOTHERGILL, A. W.; BALDASSARRI, I.; RINALDI, M. G.; SCALISE, G. In Vitro Activities of Voriconazole in Combination with Three Other Antifungal Agents against *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48: 3317–3322, 2004.

BARCHIESI, F.; GALLO, D.; CASELLI, F.; DI FRANCESCO, L. F.; ARZENI, D.; GIACOMETTI, A.; SCALISE, G. In-vitro interactions of itraconazole with flucytosine against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, 44(1):65-70, 1999.

BARNS, S. M.; LANE, D. J.; SOGIN, M. L.; BIBEAU, C.; WEISBURG, W. G. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. **J. Bacteriol.**, 173:2250-2255, 1991.

BARTIZAL, K.; GILL, C. J.; ABRUZZO, G. K.; FLATTERY, A. M.; KONG, L.; SCOTT, P. M.; SMITH, J. G.; LEIGHTON, C. E.; BOUFFARD, A.; DROPINSKI, J. F.; BALKOVEC, J. In vitro preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK- 0991 (L-743,872). **Antimicrob. Agents Chemother.**, 41:2326-2332, 1997.

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

BAUMGARTNER, C.; FREYDIERE, A. M.; GILLE, Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using *Albicans* ID and CHROMagar *Candida* plates. **J. Clin. Microbiol.**, 34:454-456, 1996.

BEN-AMI, R.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals. **Clin. Infect. Dis.**, 47:226-235, 2008.

BENNETT, J. E.; IZUMIKAWA, K.; MARR, K. A. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48:1773-1777, 2004.

BERENBAUM, M. C. A method for testing for synergy with any number of agents. **J. Infect. Dis.**, 137:122-130, 1978.

BERILA, N.; BORECKA, S.; DZUGASOVA, V.; BOJNANSKY, J.; SUBIK, J. Mutations in the CgPDR1 and CgERG11 genes in azole-resistant *Candida glabrata* clinical isolates from Slovakia. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 33(6):574-8, 2009.

BIALKOVÁ, A.; ŠUBIK, J. Biology of the Pathogenic Yeast *Candida glabrata*. **Folia Microbiol.**, 51, 3-20, 2006.

BLANCO, M. T.; CAÑADAS, J.; GARCÍA-MARTOS, P.; MARÍN, P.; GARCÍA-TAPIA, A.; RODRÍGUEZ, J. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, ketoconazole and voriconazole against *Candida glabrata*. **Rev. Esp. Quimioter.**, 22(3):139-43, 2009.

BLOCK, E. R.; BENNETT, J. E. The combined effect of 5-fluorocytosine and amphotericin B in the therapy of murine cryptococcosis. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 142(2):476-80, 1973.

BODEY, G. P.; MARDANI, M.; HANNA, H. A.; BOKTOUR, M.; ABBAS, J.; GIRGAWY, E.; HACHEM, R. Y.; KONTOYIANNIS, D. P.; RAAD, I. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. **Am. J. Med.**, 112:380-385, 2002.

BOFF, E.; LOPES, P. G.; SPADER, T.; SCHEID, L. A.; LORETO, E.; FRASSON, N.; DAL FORNO, L.; AQUINO, V.; SEVERO, L. C.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do Estado do Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 41(1):36-40, 2008.

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

BOUCHARA, J. P.; DECLERCK, P.; CIMON, B.; PLANCHENAU, C.; DE GENTILE, L.; CHABASSE, D. Routine use of CHROMagar *Candida* medium for presumptive identification of *Candida* yeast species and detection of mixed fungal populations. **Clin. Microbiol. Infectol.**, 2: 202-208, 1996.

BRANCH, R. A. Prevention of amphotericin B-induced renal impairment. A review on the use of sodium supplementation. **Arch. Intern. Med.**, 148:2389-2394, 1988.

BRUDER-NASCIMENTO, A.; CAMARGO, C. H.; SUGIZAKI, M. F.; SADATSUNE, T.; MONTELLI, A. C.; MONDELLI, A. L.; BAGAGLI, E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. **BMC Res. Notes.**, 3:3:1, 2010.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. **J. Clin. Microbiol.**, 39: 3362-3364, 2001.

CAPPELLETY, D.; EISELSTEIN-MCKITRICK, K. The echinocandins. **Pharmacotherapy**, 27(3):369-88, 2007.

CARDONA-CASTRO, N.; REVANKAR, G.; ORTIZ, P.; CUERVO, C.; KIRKPATRIK, W. R.; MCATEE, R. K.; PATTERSON, T. F. Proteinase detection, DNA typing and antimycotic susceptibility of *Candida* isolates from colombian women with vulvovaginal candidiasis. **Rev. Iberoam. Micol.**, 19: 89-94, 2002.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Rev. Iberoam. Micol.**, 23: 39-49, 2006.

CHAVES, G.M.; CAVALVANTI, M. A. Q.; PORTO, A. L. F. Pathogenicity characteristics of stocked and fresh yeast strains. **Braz. J. Microbiol.**, 34: 197-202, 2003.

CHEN, X. J.; CLARK-WALKER, G.D. The petite mutation in yeasts: 50 years on. **Internat. Rev. Cytol.** 194:197-238, 2000.

COIGNARD, C.; HURST, S. F.; BENJAMIN, L. E.; BRANDT, M. E.; WARNOCK, D. W.; MORRISON, C. J. Resolution of discrepant results for *Candida* species identification by using DNA probes. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 858-861 (2003).

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**; 36: 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, A. S.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.**, 44: 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L.R.; DE ALMEIDA MONFARDINI, L.P.; CUNHA, A.K.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R.C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect. Contr. Hosp. Epidem.**, 28(5):570-576, 2007.

CSANK, C.; HAYNES, K. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. **FEMS. Microbiol. Lett.** 189:115-120, 2000.

CUENCA-ESTRELLA, M.; DÍAZ-GUERRA, T. M.; MELLADO, E.; MONZÓN, A.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Comparative in vitro activity of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida* species from Spain. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 18(6):432-5, 1999.

DAN, M.; SEGAL, R.; MARDER, V.; LEIBOVITZ, A. *Candida* colonization of the vagina in elderly residents of a long-term-care hospital. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 25:394–396, 2006.

DANNAOUI, E.; LORTHOLARY, O.; DROMER, F. **Abstr. 13th Eur. Congr. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** Abstr. P1493, 2003.

DANNAOUI, E.; LORTHOLARY, O.; DROMER, F. In vitro evaluation of double and triple combinations of antifungal drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48(3): 970–978, 2004.

DEFONTAINE, A.; BOUCHARA, J. P.; DECLERC, P.; PLANCHENAULT, C.; CHABASSE, D.; HALLET, J. N. *In-vitro* resistance to azoles associated with mitochondrial deficiency in *Candida glabrata*. **J. Med. Microbiol.** 48: 663–670, 1999.

DENNING, D. W.; BAILY, G. G.; HOOD, S. V. Azole resistance in *Candida*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 16:261–80, 1997.

DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; BRUEGGEMANN, A. B.; COFFMAN, S. L.; DOERN, G. V.; HERWALDT, L. A.; PFALLER, M. A. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **J. Clin. Microbiol.**, 40(4): 1298-302, 2002.

DOUGLAS, C. M. Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 41:2471-2479, 1997.

DRAGO, M.; SCALTRITO, M. M.; MORACE, G. In vitro activity of voriconazole and other antifungal agents against clinical isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 23(8):619-24, 2004.

DUJON, B.; SHERMAN, D.; FISCHER, G.; DURRENS, P.; CASAREGOLA, S.; LAFONTAINE, I.; DE MONTIGNY, J.; MARCK, C.; NEUVEGLISE, C.; TALLA, E.; GOFFARD, N.; FRANGEUL, L.; AIGLE, M.; ANTHOUARD, V.; BABOUR, A.; BARBE, V.; BARNAY, S.; BLANCHIN, S.; BECKERICH, J. M.; BEYNE, E.; BLEYKASTEN, C.; BOISRAMÉ, A.; BOYER, J.; CATTOLICO, L.; CONFANIOLERI, F.; DE DARUVAR, A.; DESPONS, L.; FABRE, E.; FAIRHEAD, C.; FERRY- DUMAZET, H.; GROUPI, A.; HANTRAYE, F.; HENNEQUIN, C.; JAUNIAUX, N.; JOYET, P.; KACHOURI, R.; KERREST, A.; KOSZUL, R.; LEMAIRE, M.; LESUR, I.; MA, L.; MULLER, H.; NICAUD, J. M.; NIKOLSKI, M.; OZTAS, S.; OZIER-KALOGEROPOULOS, O.; PELLENZ, S.; POTIER, S.; RICHARD, G. F.; STRAUB, M. L.; SULEAU, A.; SWENNEN, D.; TEKAIA, F.; WESOLOWSKI-LOUVEL, M.; WESTHOF, E.; WIRTH, B.; ZENIOU-MEYER, M.; ZIVANOVIC, I.; BOLOTIN-FUKUHARA, M.; THIERRY, A.; BOUCHIER, C.; CAUDRON, B.; SCARPELLI, C.; GAILLARDIN, C.; WEISSENBAACH, J.; WINCKER, P.; SOUCIET, J. L. Genome evolution in yeasts. **Nature**, 430:35-44, 2004.

DUMAINN, V.; EYROLLE, L.; BAIXENCH, M. T.; PAUGAM, A.; LAROUSSERIE, F.; PADOIN, C.; TOD, M.; SALMON, D. Successful treatment of prosthetic knee *Candida*

glabrata infection with caspofungin combined with flucytosine. **Int. J. Antimicrob. Chemother.**, 31(4):398-9, 2008.

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

DUPONT, B. Overview of the lipid formulation of amphotericin B. **J. Antimicrob. Chemother.**, 49: 31-36, 2002.

ELIE, C. M.; LOTT, T. J.; REISS, E.; MORRISON, C. J. Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. **J. Clin. Microb.**, 36:3260-3265, 1999.

ESPINEL-INGROFF, A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; IQBAL, N.; ELLIS, D.; PFALLER, M. A.; MESSER, S.; RINALDI, M.; FOTHERGILL, A.; GIBBS, D. L.; WANG, A. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B and caspofungin. **J. Clin. Microbiol.**, 45:1811-1820, 2007.

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

FERRAZA, M. H. S. H.; MALUF, M. L. F.; CONSOLARO, M. E. L.; SHINOBU, C. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BATISTA, M. R. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Rev. Brasil. Gineco. Obst.**, v.27, n.2, p.58-63, 2005.

FIDEL, P.L. JR; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL J. D. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiol. Rev.**, 12:80–96, 1999.

FRANZOT, S. P.; CASADEVALL, A. Pneumocandin L-743,872 enhances the activities of amphotericin b and fluconazole against *Cryptococcus neoformans* in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 41(2): 331–336, 1997.

GARCIA-EFFRON, G.; MELLADO, E.; GOMEZ-LOPEZ, A.; ALCAZAR-FUOLI, L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Differences in interactions between azole drugs related to modifications in the 14-sterol demethylase gene (*cyp51a*) of *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49(5): 2119–2121, 2005.

GAREY, K. W.; REGE, M.; PAI, M. P.; MINGO, D. E.; SUDA, K. J.; TURPIN, R. S.; BEARDEN, D. T. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. **Clin. Infect. Dis.**, 43(1): 25-31, 2006.

GARNACHO-MONTERO, J.; DÍAZ-MARTÍN, A.; GARCÍA-CABRERA, E.; PIPAON, M. R.; HERNÁNDEZ-CABALLERO, C.; AZNAR-MARTÍN, J.; CISNEROS, J. M.; ORTIZ-LEYBA, C. Risk factors for fluconazole-resistant candidemia. **J. Antimicrob. Chemother.**, 54:(8), 3149–3154, 2010.

GAUR, M.; CHOUDHURY, D.; PRASAD, R. Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast, *Candida albicans*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, 9: 3-15, 2005.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, 13: 122-143, 2000.

GHANNOUM, M. A.; ISHAM, N. **Abstr. 29th Annu. Meet. Eur. Group Blood and Marrow Transplant.** Abstr. 671, 2003.

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

GRECO, W. R.; BRAVO, G.; PARSONS, J. C. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. **Pharmacol. Rev.**, 47: 331-385, 1995.

GROLL, A. H. Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigation compounds, and putative targets for antifungal drug development. **Adv. Pharm.**, 44: 343-500, 1998.

GUBBINS, P.O.; ANAISSIE, E. Overview of antifungal agents. **Infect. Dis. Spec. Edit.**, 5:65-70, 2002.

GUMBO, T.; ISADA, C. M.; HALL, G. *Candida glabrata* fungemia: Clinical features of 139 patients. **Medicine**, 78: 220-227, 1999.

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

HAJJEH, R.A.; SOFAIR, A.N.; HARRISON, L.H.; LYON, G.M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; MIRZA, S.A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M.A.; BRANDT, M.E.; WARNOCK, D.W. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **J. Clin. Microbiol.**, 42(4): 1519-1527, 2004.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **Trends Microbiol.**, 9: 591-596, 2001.

HAZEN, K.C. New and emergent yeast pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.**, 8: 462-478, 1995.

HENRY, K.W.; NICKELS, J. T.; EDLIND, T. D. Upregulation of *ERG* genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44: 2693-2700, 2000.

- HOSSAIN, M. A.; REYES, G. H.; LONG, L. A.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Efficacy of caspofungin combined with amphotericin B against azole-resistant *Candida albicans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, 51, 1427–1429, 2003
- HUGHES, C. E.; PETERSON, L. R.; BEGGS, W. H.; GERDING, D. N. Ketoconazole and flucytosine alone and in combination against *Candida* spp. in a neutropenic site in rabbits. **J. Antimicrob. Chemother.**, 18(1):65-72, 1986.
- JEU, L.; PIACENTI, F.J.; LYAKHOVETSKIY, A.G.; FUNG, H.B. Voriconazole. **Clin. Therapeut.**, 25(5):1321-1381, 2003.
- JOHNSON, M.D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J.R.; REX, J.H. Combination antifungal therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48(3): 693-715, 2004.
- JOKLIK, W.K.; WILLETT, H.P.; AMOS, D.B.; WILFERT, C.M. **Zinsser Microbiologia**. 20^aed. Buenos Aires: Editora Panamericana, 1995.
- KAHN, J. N.; HSU, M. J.; RACINE, F.; GIACOBBE, R.; MOTYL, M. Caspofungin susceptibility in *Aspergillus* and non-*Aspergillus* molds: inhibition of glucan synthase and reduction of beta-d-1,3 glucan levels in culture. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 50:2214-2216, 2006.
- KAMIYA, A.; KIKUCHI, A.; TOMITA, Y.; KANBE, T. Epidemiological study of *Candida* species in cutaneous candidiases based on PCR using primer mix specific for the DNA topoisomerase II gene. **J. Dermatol. Scien.**, 37:21-28, 2005.
- KANTARCIOGLU, A. S.; YUCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. **Mycoses** 45:160-165, 2002.
- KAO, A. S.; BRANDT, M. E.; PRUITT, W. R.; CONN, L. A.; PERKINS, B. A. STEPHENS, D. S.; BAUGHMAN, W. S.; REINGOLD, A. L.; ROTHROCK, G. A.; PFALLER, M. A.; PINNER, R. W.; HAJJEH, R. A. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. **Clin. Infect. Dis.**, 29(5):1164-70, 1999.
- KAUFFMAN, C. A.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. **Clin. Infect. Dis.**, 20: 14–18, 2000.
- KELLY, S. L.; LAMB, D. C.; CORRAN, A. J.; BALDWIN, B. C.; KELLY, D. E. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with formation of 14 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3 α ,6 α -diol. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 207: 910–915, 1995.
- KIRAZ, N.; DAG, I.; YAMAC, M.; KIREMITCI, A.; KAS, N.; AKGUN, Y. Antifungal activity of caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida glabrata*: comparison of disk diffusion, Etest, and time-kill methods. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 53(2): 788–790, 2009.

KIRAZ, N.; DAG, I.; YAMAC, M.; KIREMITCI, A.; KASIFOGLU, N.; OZ, Y. Synergistic activities of three triazoles with caspofungin against *Candida glabrata* isolates determined by time-kill, Etest, and disk diffusion methods. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 54(5): 2244–2247, 2010.

KOMSHIAN, S. V.; UWAYDAH, A. K.; SOBEL, J. D. Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. **Rev. Infect. Dis.**, 11:379–390, 1989.

KONTOYANNIS, D. P. Modulation of fluconazole sensitivity by the interaction of mitochondria and Erg3p in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Antimicrob. Chemother.**, 46: 191–197, 2000.

KRAUSE, D. S.; SIMJEE, A. E.; VAN RENSBURG, C.; VILJOEN, J.; WALSH, T. J.; GOLDSTEIN, B. P.; WIBLE, M.; HENKEL, T. A randomized, double-blind trial of anidulafungin versus fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis. **Clin. Infect. Dis.**, 39:770-775, 2004

KUCHARÍKOVÁ, S.; VAN DIJCK, P.; LISALOVÁ, M.; BUJDÁKOVÁ, H. Effect Of Antifungals On Itraconazole Resistant *Candida glabrata*. **Cent. Eup. J. Biol.**, 5(3): 318-323, 2010.

KULLBERG, B. J.; SOBEL, J. D.; RUHNKE, M.; PAPPAS, P. G.; VISCOLI, C.; REX, J. H.; CLEARY, J. D.; RUBINSTEIN, E.; CHURCH, L. W.; BROWN, J. M.; SCHLAMM, H. T.; OBORSKA, I. T.; HILTON, F.; HODGES, M. R. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for *Candidaemia* in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. **Lancet.**, 366(9495): 1435-42, 2005.

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

KUSE, E. R.; CHETCHOTISAKD, P.; DA CUNHA, C. A.; RUHNKE, M.; BARRIOS, C.; RAGHUNADHARAO, D.; SEKHON, J. S.; FREIRE, A.; RAMASUBRAMANIAN, V.; DEMEYER, I.; NUCCI, M.; LEELARASAMEE, A.; JACOBS, F.; DECRUYENAERE, J.; PITTET, D.; ULLMANN, A. J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; LORTHOLARY, O.; KOBLINGER, S.; DIEKMANN-BERNDT, H.; CORNELLY, O. A. Micafungin versus liposomal amphotericin B for *Candidaemia* and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. **Lancet.**, 369(9572): 1519-27, 2007.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINZ_VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. São Paulo, 9ªed., p.123-169, 252-340, 616-635. Sarvier, 2002.

LEWIS, R. E. Overview of the changing epidemiology of candidemia. **Curr. Med. Res. Opin.**, 25:1732-1740, 2009.

LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Rationale for combination antifungal therapy. **Pharmacotherapy**, 21:149S–164S, 2001.

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

LI, H.; QIAO, J.; WAN, Z.; ZHANG, J. In vitro interaction of itraconazole with amphotericin b, caspofungin, and terbinafine against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. **Mycopathologia**, 14: 25-30, 2010.

LIGORI, G.; LUCARIELLO, A.; COLELLA, G.; LUCA, A.; MARINELLI, P. Rapid identification of *Candida* species in oral solution by PCR. **J. Clin. Pathol.**, 60:1035-1039, 2007.

LO, H. J.; WANG, J. S.; LIN, C. Y.; CHEN, C. G.; HSIAO, T. Y.; HSU, C. T.; SU, C. L.; FANN, M. J.; CHING, Y. T.; YANG, Y. L. Efg1 involved in drug resistance by regulating the expression of *Erg3* in *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49: 1213-1215, 2005.

LUPETTI, A.; GUZZI, G.; PALADINE, A.; SWART, K.; CAMPA, M.; SENESI, S. Molecular typing of *Candida albicans* in oral candidiasis: karyotype epidemiology with human immunodeficiency virus-seropositive patients in comparison with that with healthy carriers. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 1238-1242, 1995.

LYON, G. M.; KARATELA, S.; SUNAY, S.; ADIRI, Y. Antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from the *Candida* surveillance study. **J. Clin. Microbiol.**, 48(4):1270-5, 2010.

MAERTENS, J.A. History of the development of azole derivatives. **Clin. Microbiol. Infect.**, 10 (Suppl 1):1-10, 2004.

MAESAKI, S.; KOHNO, S.; KAKU, M.; KOGA, H.; HARA, H. Effects of antifungal agent combinations administered simultaneously and sequentially against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 38(12): 2843-2845, 1994.

MALANI, A.; HMOUD, J.; CHIU, L.; CARVER, P. L.; BIELACZYK, A., KAUFFMAN, C. A. *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. **Clin. Infect. Dis.**, 41(7): 975-81, 2005.

MARICHAL, P.; VAN DEN BOSSCHE, H.; ODDS, F. C.; NOBELS, G.; WARNOCK, D. W.; TIMMERMAN, V.; VAN BROECKHOVEN, C.; FAY, S.; MOSE-LARSEN, P. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 41: 2229–2237, 1997.

MARR, K. A.; SEIDEL, K.; WHITE, T. C.; BOWDEN, R. A. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. **J. Infect. Dis.**, 181(1): 309-16, 2000.

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

MASSONET, C.; VAN ELDERE, J.; VANEECHOUTTE, M.; DE BAERE, T.; VERHAEGEN, J.; LAGROU, K. Comparison of Vitek 2 with *ITS2*-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 2209–2211, 2004.

MELETIADIS, J.; MEIS, J. F.; MOUTON, J. W.; RODRIQUEZ-TUDELA, J. L.; DONNELLY, J. P.; VERWEIJ, P. E. In vitro activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 46:62–68, 2002.

MIYAZAKI, H.; MIYAZAKI, Y.; GEBER, A.; PARKINSON, T.; HITCHCOCK, C. H.; FALKONER, D. J.; WARD, D. J.; MARDSEN, K.; BENNET, J. E. Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transporter gene, *PDHI*, in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 42:1695–1701, 1998.

MONTGOMERLE, J. Z.; EDWARDS JR, J. E.; GUZE, L. B. Synergism of amphotericin b and 5-fluorocytosine for *Candida* species. **J. Infect. Dis.**, 32(1): 82-86, 1975.

MORA-DUARTE, J.; BETTS, R.; ROTSTEIN, C.; COLOMBO, A. L.; THOMPSON-MOYA, L.; SMIETANA, J.; LUPINACCI, R.; SABLE, C.; KARTSONIS, N.; PERFECT, J. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. **N. Engl. J. Med.**, 347(25): 2020-9, 2002.

MORRELL, M.; FRASER, J.; KOLLEF, M. H. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49(9): 3640-5, 2005.

MOUDGAL, V.; LITTLE, T.; BOIKOV, D.; VAZQUEZ, J. A. Multiechinocandin-and multiazole resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49: 767-769, 2005.

MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; GHANNOUM, M. A. Combination Treatment of Invasive Fungal Infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, 18: 163–194, 2005.

NAKAYAMA, H.; NAKAYAMA, N.; ARISAWA, M.; AOKI, Y. *In vitro* and *in vivo* effects of 1a-demethylase (*ERG11*) depletion in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 45: 3037–3045, 2001.

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

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved Standard: document no, M27-A3**, Wayne, P,A: NCCLS, 2008.

NGUYEN, M. H.; YU, C. Y. Voriconazole against fluconazole-susceptible and resistant *Candida* isolates: in-vitro efficacy compared with that of itraconazole and ketoconazole. **J. Antimicrob. Chemother.**, 42(2): 253-6, 1998.

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

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J. Antimicrob. Chemother.**, 52:1, 2003.

ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; COOPER, J. R.; FOTHERGILL, A.; PASARELL, L.; CGINNIS, M. R. *Candida* and *Torulopsis*: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. **J. Clin. Microbiol.** 35, 313–316, 1997.

OLSON, J. A.; ADLER-MOORE, J. P.; SMITH, P. J.; PROFFITT, R. T. Treatment of *Candida glabrata* infection in immunosuppressed mice by using a combination of liposomal amphotericin B with caspofungin or micafungin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49:4895–4902, 2005.

ONYEWU, C.; BLANKENSHIP, J. R.; DEL POETA, M.; HEITMAN, J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47:956-964, 2003.

OZ, Y.; AKŞIT, F.; KIRAZ, N.; KIREMITÇI, A. Short communication: In vitro activity of amphotericin B with fluconazole or voriconazole combinations against *Candida albicans* isolates. **Mikrobiyol. Bul.**, 42(1):149-55, 2008.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D.; BENJAMIN JR, D. K.; CALANDRA, T. F.; EDWARDS JR., J. E.; FILLER, S. G.; FISHER, J. F.; KULLBERG, B. J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, 48:503-535, 2009.

PATTON, L.L.; BONITO, A.J.; SHUGARS, D.A. A systematic review of the effectiveness of antifungal drugs for the prevention and treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, 92(2):170-179, 2001.

PETRON, M. A.; ROGERS, T. R. Interactions *in vitro* between polyenes and imidazoles against yeasts. **J. Antimicrob. Chemother.**, 27, 491-506, 1991.

PEYRON, F.; FAVEL, A.; CALAF, R.; MICHEL-NGUYEN, A.; BONALY, R.; COULON, J. Sterol and fatty acid composition of *Candida lusitanae* clinical isolates. **J. Antimicrob. Chemother.**, 46(2): 531–533, 2002.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 46(4): 1032-7, 2002a.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. **J. Clin. Microbiol.**, 40(3): 852-6, 2002b.

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

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location. **J. Clin. Microbiol.**, 41(5): 2176-9, 2003b.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. **Clin. Microbiol. Infect.**, 10(1): 11-23, 2004a.

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

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. **J. Clin. Microbiol.**, 42(7): 3142-6, 2004c.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. Clinical evaluation of a dried commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing of five antifungal agents against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, 50(2):113-7, 2004d.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; RINALDI, M. G.; BARNES, R.; HU, B.; VESELOV, A.; TIRABOSCHI, N.; NAGY, E.; GIBBS, D. L. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. **J. Clin. Microbiol.**, 12: 5848-59, 2005.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. A. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.**, 20: 133-163, 2007.

PFALLER, M. A., BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; KROEGER, J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. **J. Clin. Microbiol.**, 46:150-156, 2008.

PIENS M.A., PERRY J.D., RABERIN H., PARANT F., FREYDIERE A.M.: Routine system of a one-minute trehalase and maltase test for the identification of *Candida glabrata* in four laboratories. **J. Clin. Pathol.**, 56: 687–689, 2003.

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

POLAK, A. Combination therapy of experimental candidiasis, cryptococcosis, aspergillosis and wangiellosis in mice. **Chemotherapy**, 33(5):381-95, 1987.

POLAK, A. Synergism of polyene antibiotics with 5-fluorocytosine. **Chemotherapy.**, 24(1):2-16, 1978.

POLAK, A.; SCHOLER, H. J.; WALL, M. Combination therapy of experimental candidiasis, cryptococcosis and aspergillosis in mice. **Chemotherapy**, 28(6):461-79, 1982.

POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M; FIORI, B.; LA SORDA, M.; SPANU, T.; SANGLARD, D.; FADDA, G. Caspofungin activity against clinical isolates of azole cross-resistant *Candida glabrata* overexpressing efflux pump genes. **J Antimicrob Chemother.** 58(2):458-61, 2006a.

POSTERARO, B.; TUMBARELLO, M.; LA SORDA, M.; SPANU, T.; TRECARICHI, E. M.; DE BERNARDIS, F.; SCOPPETTUOLO, G.; SANGUINETTI, M.; FADDA, G. Azole resistance of *Candida glabrata* in a case of recurrent fungemia. **J. Clin. Microbiol.**, 44(8):3046-7, 2006b.

POYNTON, C. H.; BARNES, R. A.; REES, J. Interferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for the treatment of hepatosplenic candidosis in patients with acute leukemia. **Clin. Infect. Dis.**, 26(1): 239-40, 1998.

QUINDÓS, G.; CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; ARÉVALO, M. P.; SALGADO, J.; ALONSO-VARGAS, R.; RODRIGO, J. M.; RUESGA, M. T.; VALVERDE, A.; PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; PONTÓN, J. In vitro susceptibility of *Candida dubliniensis* to current and new antifungal agents. **Chemotherapy**, 46(6): 395-401, 2000.

QUINDÓS, G.; CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; ERASO, E.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J. Actividad antifúngica in vitro de voriconazol: Nuevos datos después de los primeros años de experiencia clínica. **Rev. Iberoam. Micol.**, 24: 198-209, 2007.

REX, J. H.; BENNETT, J. E.; SUGAR, A. M.; PAPPAS, P. G.; VAN DER HORST, C. M.; EDWARDS, J. E.; WASHBURN, R. G.; SCHELD, W. M.; KARCHMER, A. W.; DINE, A. P. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. **N. Engl. J. Med.**, 331(20): 1325-30, 1994

REX, J. H.; PAPPAS, P. G.; KARCHMER, A. W.; SOBEL, J.; EDWARDS, J. E.; HADLEY, S.; BRASS, C.; VAZQUEZ, J. A.; CHAPMAN, S. W.; HOROWITZ, H. W.; ZERVOS, M.; MCKINSEY, D.; LEE, J.; BABINCHAK, T.; BRADSHAW, R. W.; CLEARY, J. D.; COHEN, D. M.; DANZIGER, L.; GOLDMAN, M.; GOODMAN, J.; HILTON, E.; HYSLOP, N. E.; KETT, D. H.; LUTZ, J.; RUBIN, R. H.; SCHELD, W. M.; SCHUSTER, M.; SIMMONS, B.; STEIN, D. K.; WASHBURN, R. G.; MAUTNER, L.; CHU, T. C.; PANZER, H.; ROSENSTEIN, R. B.; BOOTH, J. A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole plus placebo versus fluconazole plus amphotericin B as therapy for candidemia and its consequences in nonneutropenic subjects. **Clin. Infect. Dis.**, 36(10): 1221-8, 2003.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; GALGIANI, J. N.; BARTLETT, M. S.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; LANCASTER, M.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; WALSH, T. J.; BARRY, A. L. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. **Clin. Infect. Dis.**, 24(2): 235-47, 1997.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin. Microbiol. Rev.**, 14:643-658, 2001.

ROBERT, R.; NAIL, S.; MARLOT-LEBLOND, A.; COTTIN, J.; MIEGEVILLE M., QUENOILLERE, S.; MAHAZA, C.; SENET, J. M. Adherence of platelets to *Candida* species *in vivo*. **Infect. Immun.** 68; 570-576, 2000.

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

SÁNCHEZ-VARGAS, L. O.; PÉREZ-RIOS, P.; ROMO-GARCÍA, J.; CORONAZQUIERDO, F. P.; HIDALGO-LOPERENA, H.; FRANCO-MARTÍNEZ, F. Determinación de pH salival y cultivo en pacientes con candidosis bucal VIH positivos y VIH negativos. **Rev. Iberoam. Micol.**, 19: 155-160, 2002.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; BILLE J. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 45:1174-1183, 2001

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; CALABRESE, D.; MAJCHERCZYK, P. A.; BILLE, J. The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 43:2753-2765, 1999.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; RANNO, S.; TORELLI, R.; FADDA, G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49: 668–679, 2005.

SCHEVEN, M.; SCHWEGLER, D. F. Antagonistic interactions between azoles and amphotericin b with yeasts depend on azole lipophilia for special test conditions *in vitro*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 39(8): 1779–1783, 1995.

SCHUMAN, P.; SOBEL, J. D.; OHMIT, S. E.; MAYER, K. H.; CARPENTER, C. C.; ROMPALO, A.; DUERR, A.; SMITH, D. K.; WARREN, D.; KLEIN, R. S. Mucosal *Candidal* colonization and candidiasis in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. HIV Epidemiology Research Study (HERS) Group. **Clin. Infect. Dis.**, 27:1161-1167, 1998.

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

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

SIAU, H.; KERRIDGE, D. The effect of antifungal drugs in combination on the growth of *Candida glabrata* in solid and liquid media. **J. Antimicrob. Chemother.**, 41(3):357-66, 1998.

SIDRIM, J.C.; ROCHA, F. **Micologia médica a luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara, p.265-274, 2004.

SILVA, E. G.; PAULA, C. R.; DIAS, A. L.; CHANG, M. R.; RUIZ, L. D.; GAMBALE, V.; PRATES, R. A.; RIBEIRO, M. S. Combination efficacy of voriconazole and amphotericin b in the experimental disease in immunodeficient mice caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathology**, 24: 31-36, 2010.

SOBEL, J. D. Management of Infections Caused by *Candida glabrata*. **Curr. Infect. Dis. Report.**, 2:424–428, 2000.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacol. Aplic. Méd. Vet.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 752p.

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

SUGAR, A. M.; LIU, X. Interactions of itraconazole with amphotericin b in the treatment of murine invasive candidiasis. **J. Infect. Dis.**, 177:1660–3, 1998.

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

TAMURA, N. K.; NEGRI M. F. N.; BONASSOLI, L. A.; VIDZINSKI, T. I. E. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.**, v..40, n.1, 2007.

TE DORSTHORST, D. T. A.; VERWEIJ, P. E.; MELETIADIS, J.; BERGERVOET, M.; PUNT, N. C.; MEIS, J. F. G. M.; MOUTON, J. W. In vitro interaction of flucytosine combined with amphotericin B or fluconazole against thirty-five yeast isolates determined by both the fractional inhibitory concentration index and the response surface approach. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 46:2982–2989, 2002.

TOBUDIC, S.; KRATZER, C.; LASSNIGG, A.; GRANINGER, W.; PRESTERL, E. In vitro activity of antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms. **J. Antimicrob. Chemother.**, 65(2):271-4, 2010.

TRICK, W. E.; FRIDKIN, S. K.; EDWARDS, J. R.; HAJJEH, R. A.; GAYNES, R. P. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clin. Infect. Dis.** 35:627-630, 2002.

TUMBARELLO, M.; SANGUINETTI, M.; TRECARICHI, E. M.; SORDA, M. L.; ROSSI, M.; CAROLIS, E.; DONATI, K. G.; FADDA, G.; CAUDA, R.; POSTERARO, B. Fungaemia caused by *Candida glabrata* with reduced susceptibility to fluconazole due to altered gene expression: risk factors, antifungal treatment and outcome. **J. Antimicrob. Chemother.**, 62, 1379–1385, 2008.

URIZAR JMA. Candidiasis orales. **Rev. Iberoam. Micol.**, 19: 17-21, 2002.

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

VANDEPUTTE, P.; TRONCHIN, G.; BERGES, T.; HENNEQUIN, C.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. P. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the *ERG6* gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 51: 982-990, 2007.

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

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

VERMITSKY, J. P.; EDLIND, T. D. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48:3773-3781, 2004.

WAHYUNINGSIH, R.; FREISLEBEN, H.; SONNTAG, H.; SCHNTZLER, P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. **J. Clin. Microbiol.**, 38:3016-3021, 2000.

WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungals infections. **Jpn. J. Med. Mycol.**, 48, 1-12, 2007.

WEIG, M.; JANSCH, L.; GROSS, U.; DE KOSTER, C. G.; KLIS, F. M.; DE GROOT, P. W. Systematic identification *in silico* of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*. **Microbiology**, 150: 3129–3144, 2004.

WEY, S. B.; MORI, M.; PFALLER, M. A.; WOOLSON, R. F.; WENZEL, R. P. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. **Arch. Intern. Med.**, 148(12): 2642-5, 1988.

WHELAN, W. L.; SIMON, S.; BENEKE, E. S.; ROGERS, A. L. Auxotrophic variants of *Torulopsis glabrata*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 24:1–4, 1984.

WHITE, D. J.; HABIB, A. R.; VANTHUYNE, A.; LANGFORD, S.; SYMONDS, M. Combined topical flucytosine and amphotericin B for refractory vaginal *Candida glabrata* infections. **Sex. Transm. Inf.**, 77:212–213, 2001.

WILLINGER B., MANAFI M. Evaluation of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. **Mycoses**, 42: 61–65, 1999.

WILSON, G. A.; MICEK, S. T.; RITCHIE, D. J. A retrospective evaluation of fluconazole for the treatment of *Candida glabrata* fungemia. **Clin. Therap.**, 28:(8), 1228 – 1237, 2005.

WINSTON, D. J.; PAKRASI, A.; BUSUTTIL, R. W. Prophylactic fluconazole in liver transplant recipients. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Ann. Intern. Med.**, 131(10): 729-37, 1999.

ZAOUTIS, T. E.; ARGON, J.; CHU, J.; BERLIN, J. A.; WALSH, T. J.; FEUDTNER C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. **Clin. Infect. Dis.**, 41(9): 1232-9, 2005.

ZEPELIN, M. B.; KUNZ, L.; CHEL, R.R.; REICHARD, U.; WEIG, M.; GROB, U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. **J. Antimicrob. Chemother.** 60, 424–428, 2007.