

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Microbiologia

**Rosana de Carvalho Cruz**

**Condições experimentais para a determinação  
da susceptibilidade de *Paracoccidioides  
brasiliensis* e seleção de subpopulações menos  
sensíveis a antifúngicos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Microbiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Silva Cisalpino  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Alves Gouveia

Belo Horizonte  
2011

Este estudo foi realizado no Laboratório de Biologia de Microrganismos,  
Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio financeiro: CNPq e Fapemig

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,  
mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo.  
E que posso evitar que ela vá à falência.  
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver  
apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.  
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e  
se tornar um autor da própria história.  
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar  
um oásis no recôndito da sua alma.  
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.  
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.  
É saber falar de si mesmo.  
É ter coragem para ouvir um 'não'.  
É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

**(Fernando Pessoa)**

Dedico este trabalho ao meu marido e grande amor Tel. Mais uma etapa que  
vencemos juntos... Obrigada pela cumplicidade.

## **Agradecimentos**

À Deus primeiramente. Ante todas as dádivas recebidas e sempre estar presente me mostrando a grandiosidade da vida em todas as suas nuances, como posso duvidar de Tua existência?

À professora e minha orientadora Patrícia. Eu sinceramente agradeço a oportunidade de trabalhar com você; pela preocupação comigo, no início, para que eu trabalhasse com o que eu gostasse; por me apresentar de forma apaixonante a um dos microrganismos mais intrigantes que eu tive a sorte de conhecer. Aprendi com você ensinamentos que guardarei por toda vida. Obrigada pelas conversas sempre regadas com um banho de sabedoria.

À professora e co-orientadora Viviane. Obrigada pela ajuda prestada principalmente nesta reta final do trabalho e pela convivência agradável e divertida.

À professora Betinha, pela convivência, amizade, carinho e gentileza com que me ajudou no exame de qualificação, e pelas sugestões sempre bem vindas.

À professora Daniele pela convivência, disponibilidade e simpatia que tornam os dias mais nebulosos leves e agradáveis para todos que a cercam.

À professora Sueli pelo carinho e preocupação com o meu bem-estar. Que Deus sempre te ilumine!

À professora Maria Aparecida (Cidinha) pelo uso ilimitado do laboratório, pelo carinho e conversas agradáveis, pela confiança e por me introduzir no maravilhoso mundo didático das aulas.

Ao professor Daniel Assis pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei. Obrigada pelas correções do artigo, pelas conversas e pelo carinho dispensado a mim.

A todos os professores do departamento de Microbiologia pelas excelentes aulas ministradas durante meu curso de doutorado. Quando cheguei aqui, não fazia idéia de como o mundo da microbiologia é rico, incrível e apaixonante.

À professora Mônica pelo carinho, incentivo, confiança e conversas agradáveis, me ouvindo e me trazendo a razão sempre que precisei.

À Gilvânia, nossa técnica “bombril” do laboratório. Obrigada por toda ajuda e por ser sempre tão prestativa. Sempre dizia a ela que determinado material poderia esperar para ficar pronto e no dia seguinte, lá estava: embalado, esterilizado e armazenado com carinho para que eu pudesse usar com confiança. Como se não bastasse o excelente profissionalismo, sua alegria de viver tornam os dias no laboratório, maravilhosos... Obrigada pela pessoa cativante que você é.

A toda a equipe do laboratório LIMHO em especial a Ludmila (que chegou, abalou e conquistou todo mundo!) e Marina (sempre doce e carinhosa com todos que a cercam); Yuri (ex-lab e ex-estagiário), Daniel, Caio, Flávio, Vivian, Renata, Fred, Carol PCR, Débora, Raquel, Zélia, Celso, Tiago, Lucas, Suzana, Nívea, Marco Aurélio, Fernanda, Valéria e tantos outros que tornaram os dias agradáveis, divertidos e prazerosos. Enfim, uma família unida por paixão pela ciência!

A todos da secretaria da pós-graduação, especialmente ao Douglas, Tiago, Gina e Iracema pela disponibilidade e ajuda sempre que precisei.

Ao programa de pós-graduação pela oportunidade da realização do doutorado em um departamento cuja excelência é reconhecida no país todo.

À agência CNPq pelo apoio financeiro que permitiu minha dedicação exclusiva ao curso e pelo financiamento do projeto de doutorado.

## **O tempo passa... A vida passa... As pessoas passam...**

Algumas pessoas entram em nossa vida e simplesmente passam. Talvez seja assim por culpa nossa, que muitas vezes devido à vida atribulada que levamos não nos damos conta e perdemos a oportunidade de conhecer e conviver com pessoas maravilhosas. Mas, às vezes, paramos e observamos ao nosso redor... E nos deparamos com pessoas verdadeiramente especiais que nos presenteiam com sua presença e se tornam verdadeiros amigos. Para mim, amizade é assim: quando alguém aceita fazer parte da nossa vida e contribuir para nosso aprendizado. Essas pessoas me aceitaram como sou e com todos os meus defeitos e qualidades. A essas pessoas eu devo, no mínimo, um agradecimento especial...

À Betânia. Você entrou na minha vida para me ensinar a fazer o ensaio de determinação de CIM, e não só o fez com carinho e maestria como também me ajudou muito ao longo desses quatro anos e agora no final, me mostrando que existe luz no fim do túnel. Nossa convivência se expandiu para além do laboratório e dela, nasceu uma amizade tão leve, gostosa e sincera que parece que nos conhecemos a vida toda! Você é uma pessoa especial onde habita Deus. Obrigada por me dar a honra de sua amizade.

À Paty Campi. Ou devo dizer Super Paty? Você entrou na minha vida para me ensinar a manipular *P. brasiliensis* e a fazer meio YPD em tubos inclinados, e o fez com disciplina, destreza, seriedade e poucas palavras. Com o passar do tempo, a convivência mostrou se tratar de uma pessoa doce, sincera, agradável, prestativa e divertida. Sempre que pensava: A Paty não existe, lá vinha você dizendo que “nesta semana estou mais tranquila na bancada, quer que eu te ajude em alguma coisa? Qualquer coisa?” E era qualquer coisa mesmo: uma solução, um meio de cultura, lavar um material, esterilizar algo, ajudar em um experimento e depois adotá-lo, a tirar fotos (todas as fotos...). E sempre fez isso com um carinho, disciplina, amor e humildade encontrados apenas nas pessoas mais nobres. Aprendi muito com você. Obrigada querida amiga, por tudo.

À Mila. Quando você entrou na minha vida, nos iríamos trabalhar com *Aggregatibacter actinomycetenum*. Você continuou trabalhando com esse microrganismo e eu, migrei feliz para o *P. brasiliensis*. Mas o dia-a-dia com você me fez perceber o quão responsável, disciplinada, simpática e alegre você é. Costumo dizer que um dia, quando crescer, quero ser como você. Obrigada por me deixar aprender com você, por fazer parte do meu cotidiano e pelas inúmeras conversas.

Ao Talles. Você entrou na minha vida durante a graduação e passou. Mas, num momento de sorte, a vida me presenteou de novo com a sua presença me proporcionando conviver novamente com você. E parece que o tempo não passou, pois percebi que a amizade que nasceu na graduação perdurou e sobreviveu ao implacável poder do tempo. Obrigada pela disponibilidade em ajudar e em conversar sempre que eu precisei. Agora sei que seremos amigos para sempre.

À Silvia e a Carol. Vocês entraram na minha vida como estagiárias em momentos diferentes e foram as que conviveram diretamente comigo, muitas vezes tolerando minhas variações de humor com carinho e paciência. Silvia, nós aprendemos CIM juntas e eu aprendi com você a levar a vida com menos seriedade, ser responsável, mais tolerante com as coisas (principalmente quando sumiam) e a me divertir no trabalho. Carol, eu aprendi com você a ser objetiva e a respeitar diferenças; e no final fui presenteadada com seu carinho e consideração se preocupando em não me deixar na mão quando decidiu seguir outro caminho. Meus experimentos não poderiam ser realizados sem a ajuda de vocês. Considero-me uma pessoa de muita sorte por ter trabalhado com estagiárias tão maravilhosas. Desejo a vocês sorte e sucesso no caminho que escolheram e, sinceramente, obrigada.

À minha família. Não escolhemos a família que temos, mas acho que não poderia ter ganhado uma melhor. A minha é o pilar onde me escoro, onde aprendi os valores que hoje regem minha vida. E, apesar da distância muitas vezes imposta pelas atribulações da vida, sei que torcem por mim e querem que o melhor me aconteça. Obrigada por sempre estarem em minha vida,

mesmo a distância. Luciana, obrigada pelas conversas de incentivo ao telefone, me ajudou mais do que você imagina...

Ao meu grande amor Tel. Você entrou na minha vida e a transformou de forma irreversível. Não poderia ter ganhado da vida um presente melhor. Você ama, se preocupa, vibra, se enfurece, se alegra e se entristece comigo; um verdadeiro companheiro que agora fez o doutorado comigo, pois compartilhou de todas as minhas alegrias e angústias. Espero que você permaneça na minha vida para sempre. Obrigada é pouco. Eu amo você.



## Resumo

*Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), é um fungo dimórfico: - cresce micelial (M) à temperatura ambiente e leveduriforme (L) à 37°C. Várias drogas estão disponíveis para o tratamento da PCM, contudo, as metodologias-padrão propostas pelo *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI) para a determinação de susceptibilidade “*in vitro*” aos antifúngicos para fungos filamentosos e leveduras não incluiu *P. brasiliensis*. Neste estudo, a partir de parâmetros iniciais indicados no documento CLSI (M27-A2), testaram-se, por microdiluição, várias condições experimentais (tamanho do inoculo, períodos de leitura, meios de cultura, temperaturas de incubação), ensaiadas para os antifúngicos anfotericina B, itraconazol, cetoconazol, fluconazol, sulfametoxazol, bactrim e terbinafina, frente a vinte e um isolados clínicos e ambientais. Avaliou-se a atividade fungicida ou fungistática das drogas. Os melhores resultados foram obtidos após 15 dias de incubação. Observou-se que para um determinado isolado, sob igual temperatura e tempo de leitura, havia diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) nos valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) nos três meios de cultura (exceto fluconazol, nos meios MHM e MVM, à 37°C). No meio RPMI, 81% dos isolados mostraram transição de levedura para micélio, a 37°C, independente da presença de antifúngicos. A temperatura de incubação influenciou significativamente os valores de CIM ( $P < 0,05$ ). O meio MVM mostrou-se o mais efetivo para observação da atividade antifúngica e determinação de CIM para sulfametoxazol e para a combinação sulfametoxazol/trimetopim (CIMs de 1,17-18,75 µg/mL a 37°C). Nos meios RPMI e MHM, os valores registrados foram de 150-300 µg/mL e 75-300 µg/mL para sulfametoxazol e 9,37-150 µg/mL e 18,75-300 µg/mL, respectivamente. Sob as condições empregadas, a anfotericina B mostrou-se fungicida contra todos os isolados. Os demais antifúngicos, para um mesmo isolado, apresentaram alternadamente perfil fungicida ou fungistático, tanto nos cultivos oriundos do meio RPMI quanto de MHM. Os isolados que apresentaram maiores valores de CIM foram escolhidos para seleção de subpopulações tolerantes a concentrações crescentes de antifúngicos incorporados ao Agar YPD, a 37°C. Selecionaram-se dois clones a partir do isolado parental Pb4 e dois a partir de Pb09, os quais cresceram em 700 µg/mL de sulfametoxazol, mantendo a estabilidade do fenótipo; dois clones do parental Tatu e um de Pb03 cresceram em 600 µg/mL da droga; um clone de Pb2 e dois de Pb18 cresceram em 500 µg/mL de sulfametoxazol. Para o fluconazol, 4 clones do parental Ed01 cresceram em 6 µg/mL, um clone do parental Tatu cresceu em 7 µg/mL e outro em 9 µg/mL, valores estes correspondentes a, respectivamente, três, sete e nove vezes o valor da CIM dos parentais. Na temperatura ambiente, a partir do isolado parental B339, foram selecionadas colônias na presença de 300 µg/mL de sulfametoxazol. Após cultivos sucessivos e aumento da concentração do antifúngico, três clones (BCL1, BCL2 e BCL4) desenvolveram-se em 400 µg/mL. Curiosamente, todos apresentaram morfologia atípica caracterizada por colônias de aspecto cerebriforme e, à microscopia, células leveduriformes, fenótipo permaneceu estável na temperatura ambiente, mesmo na ausência do antifúngico. Acredita-se que a seleção dessas subpopulações de *P. brasiliensis* tolerantes a concentrações elevadas de sulfametoxazol e de fluconazol e aquela que exibe bloqueio na transição dimórfica apresentem interesse como objetos do estudo desses processos biológicos.

Palavras-chave; *Paracoccidioides brasiliensis*, CIM, agentes antifúngicos, seleção, resistência, morfogênese, dimorfismo

## Abstract

*Paracoccidioides brasiliensis*, the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), is a dimorphic fungus, growing mycelial (M) at room temperature and yeast-like (L) at 37°C. Several drugs are available for the treatment of PCM, however, the standard methods proposed by the *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI) for determination of the "*in vitro*" antifungal susceptibility of filamentous fungi and yeasts did not include *P. brasiliensis*. In this study, on the basis of parameters indicated in the document M27-A2 (CLSI), experimental conditions such as size of the inoculum, reading periods, culture media, and incubation temperatures, were assayed employing twenty-one clinical and environmental isolates by the microdilution method to amphotericin B, itraconazole, ketoconazole, fluconazole, sulfamethoxazole, combination sulfamethoxazole/trimetopim and terbinafine. We evaluated the fungistatic or fungicidal activities of the drugs tested. The best results were obtained after 15 days of incubation. For a given isolate under the same temperature and time of reading, it was observed that the minimum inhibitory concentrations (MICs) were significantly different in all three media tested ( $P < 0.05$ ) (except for fluconazole, in MHM and MVM media, at 37°C). In RPMI, 81% of the isolates showed the yeast to mycelium transition at 37°C, regardless of the presence of the antifungal agents. The temperature of incubation did significantly influence the MIC values ( $P < 0.05$ ). The MVM culture medium proved to be the most effective for the observation of antifungal activity and determination of the MIC of sulfamethoxazole and the sulfamethoxazole/trimetopim combination (MICs of 1, 17-18,75 µg/mL to both at 37°C). The values recorded in RPMI and MHM media were 150-300 µg/mL e 75-300 µg/mL to sulfamethoxazole e 9,37-150 µg/mL e 18,75-300 µg/mL to combination sulfamethoxazole /trimetopim, respectively. Amphotericin B showed fungicidal against all isolates. For the other antifungal agents, the same isolate showed either fungicidal or fungistatic profiles in cultures coming either from RPMI or MHM media. Isolates that have shown the higher MIC values were chosen for the selection of fungal subpopulations tolerant to increasing concentrations of antifungal agents, at 37°C. Drugs have been incorporated into YPD agar. Two clones selected from the parental Pb4 isolate and two from Pb09 grew at 700 µg/mL of sulfamethoxazole, keeping the stability of the phenotype; two clones from the parental isolate Tatu and one of Pb03 grew at 600 µg/mL of the drug, one clone from the parental Pb2 and two from Pb18 grew at 500 µg/mL of sulfamethoxazole. For fluconazole, so far, four clones of the parental ED01 grew at 6 µg/mL. One clone from the parental isolate Tatu grew at 7 µg/mL and a second at 9 µg/mL. These values correspond, respectively, to three, seven and nine times the original MIC values of the parentals. At room temperature, some colonies selected from the parental isolate B339 grew in the presence of 300µg/mL of sulfamethoxazole. After adapted at increasing concentration of the antifungal agent, three clones (BCL1, BCL2 and BCL4) developed in 400 µg/mL. All these clones exhibited atypical morphology, showing cerebriform colonies and at the microscope, yeast cells. This phenotype remained stable at room temperature, even in the absence of antifungal. These of *P. brasiliensis* sub-populations either those tolerant *in vitro* to higher concentrations of sulfamethoxazole and fluconazole as well as that displaying a blockage in dimorphic transition would be of interest in studying these biological processes.

Key-words; *Paracoccidioides brasiliensis*, MIC, antifungal agents, selection, resistance, morphogenesis, dimorphism

## Lista de Figuras

|  |     |
|--|-----|
| Figura 1: Morfologia da amostra Pb18 de <i>P. brasiliensis</i> no início e ao fim do ensaio de determinação de CIM em caldo RPMI, a 37°C ..... | 72  |
| Figura 2: Acompanhamento micromorfológico de amostras de <i>P. brasiliensis</i> em diferentes condições experimentais .....                    | 75  |
| Figura 3: Ação fungicida ou fungistática de antimicrobianos para a amostra Pb18 .....  | 85  |
| Figura 4: Documentação fotográfica representativa de um ensaio de determinação de CIM por incorporação em ágar .....                           | 88  |
| Figura 5: Morfologia da amostra Pb4 ao final do ensaio de determinação da CIM por incorporação em ágar .....                                   | 89  |
| Figura 6: Acompanhamento do crescimento da amostra Ed01 em MHM a 37°C .....  | 93  |
| Figura 7: Acompanhamento do crescimento da amostra Pb4 (1017) em MVM a 37°C .....  | 94  |
| Figura 8: Aspecto macromorfológico de clones de <i>P. brasiliensis</i> menos susceptíveis ao fluconazol .....                                  | 96  |
| Figura 9: Seleção de subpopulações de <i>P. brasiliensis</i> por meio da técnica de PU em sulfametoxazol .....                                 | 99  |
| Figura 10: Aspecto macromorfológico de clones <i>P. brasiliensis</i> selecionados em concentrações crescentes de sulfametoxazol .....          | 100 |
| Figura 11: Morfologia leveduriforme do clone Pb09s71 .....   | 103 |
| Figura 12: Morfologia atípica em temperatura ambiente de um clone de <i>P. brasiliensis</i> derivado da amostra B339 .....                     | 105 |
| Figura 13: Morfologia colonial cerebriforme de clones da amostra B339 em temperatura ambiente .....  | 106 |
| Figura 14: Comparação da morfologia microscópica da amostra parental B339 com o clone BCL4 em diferentes condições de cultivo .....            | 107 |
| Figura 15: Confirmação da identidade molecular do clone BCL4 por Nested PCR .....  | 108 |
| Figura 16: Acompanhamento morfológico de clones da amostra Tatu em temperatura ambiente .....  | 111 |
| Figura 17: Análise da expressão protéica diferencial por 2-DE .....  | 112 |

## Lista de tabelas

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 1: Amostras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> usadas nesse trabalho .....   | 52  |
| Tabela 2: Composição detalhada do meio RPMI 1640 .....   | 160 |
| Tabela 3: Composição do meio MVM .....   | 161 |
| Tabela 4: Iniciadores usados para amplificação por Nested PCR .....  | 65  |
| Tabela 5: Comparação entre quantificação espectrofotométrica (transmitância) e quantificação por contagem do número de células em câmara de Neubauer de amostras de <i>P. brasiliensis</i> .....   | 163 |
| Tabela 6: Determinação de CIM dos antimicrobianos anfotericina B, itraconazol, cetoconazol, fluconazol, sulfametoxazol, bactrim e terbinafina frente a 21 amostras clínicas e ambientais de <i>P. brasiliensis</i> em diferentes condições experimentais ..... | 71  |
| Tabela 7: Determinação da CIM para Anfotericina B ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes condições experimentais .....   | 165 |
| Tabela 8: Determinação da CIM para Itraconazol ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes condições experimentais .....  | 166 |
| Tabela 9: Determinação da CIM para Cetoconazol ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes condições experimentais .....  | 167 |
| Tabela 10: Determinação da CIM para Fluconazol ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes condições experimentais .....  | 168 |
| Tabela 11: Determinação da CIM para Sulfametoxazol ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes condições experimentais .....  | 169 |
| Tabela 12: Determinação da CIM para Bactrim® ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes condições experimentais .....  | 170 |
| Tabela 13: Determinação da CIM para Terbinafina ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes condições experimentais .....   | 171 |
| Tabela 14: Tratamento estatístico dos valores de CIM para Anfotericina B em diferentes condições experimentais .....   | 173 |
| Tabela 15: Tratamento estatístico dos valores de CIM para Itraconazol em diferentes condições experimentais .....  | 174 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 16: Tratamento estatístico dos valores de CIM para Cetoconazol em diferentes condições experimentais .....  | 175 |
| Tabela 17: Tratamento estatístico dos valores de CIM para Fluconazol em diferentes condições experimentais .....   | 176 |
| Tabela 18: Tratamento estatístico dos valores de CIM para Sulfametoxazol em diferentes condições experimentais .....   | 177 |
| Tabela 19: Tratamento estatístico dos valores de CIM para Bactrim® em diferentes condições experimentais .....   | 178 |
| Tabela 20: Tratamento estatístico dos valores de CIM para Terbinafina em diferentes condições experimentais .....  | 179 |
| Tabela 21: Acompanhamento do aspecto morfológico de <i>P. brasiliensis</i> sob diferentes condições de determinação de CIM, à 37°C .....   | 181 |
| Tabela 22: Valores de CIM, após 15 dias de incubação, dos antimicrobianos Anfotericina B, Itraconazol, Cetoconazol, Fluconazol, Sulfametoxazol, Bactrim® e Terbinafina frente a 21 amostras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> cultivados em diferentes meios de cultura a 37°C ..... | 183 |
| Tabela 23: Valores de CIM, após 15 dias de incubação, dos antimicrobianos Anfotericina B, Itraconazol, Cetoconazol, Fluconazol, Sulfametoxazol, Bactrim® e Terbinafina frente a 21 amostras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> cultivados em diferentes meios de cultura em TA .....  | 184 |
| Tabela 24: Comparação entre o valor de CIM determinado por leitura visual e por leitura com MTT por absorbância de ensaio para Anfotericina B em RPMI a 37° .....  | 82  |
| Tabela 25: Comparação entre o valor de CIM determinado por leitura visual e por leitura com MTT por absorbância de ensaio para itraconazol em RPMI a 37°C .....  | 83  |
| Tabela 26: Síntese da atividade Fungicida (Fc) ou Fungistática (Fe) de antifúngicos frente a 21 amostras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> vindos do ensaio de determinação de CIM com os meios RPMI e MMH à 37°C .....  | 84  |
| Tabela 27: Ação fungicida ou fungistática de antifúngicos frente às amostras de <i>P. brasiliensis</i> provenientes do ensaio de determinação de CIM com os meios RPMI e MHM à 37°C .....  | 186 |
| Tabela 28: Análise comparativa dos valores de CIM (µg/mL) resultantes de ensaios de determinação em meio RPMI caldo e ágar RPMI, à 37°C .....  | 87  |

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 29: Análise do crescimento de <i>P. brasiliensis</i> em repiques sucessivos em diferentes meios de cultura, a 37°C .....  | 188 |
| Tabela 30: Valores de CIM para sulfametoxazol determinados a 37°C frente a <i>P. brasiliensis</i> em caldo e ágar RPMI e em ágar YPD .....   | 190 |
| Tabela 31: Subpopulações de amostras de <i>P. brasiliensis</i> menos susceptíveis a concentrações de fluconazol e sulfametoxazol incorporado ao Agar YPD, a 37°C .....   | 97  |
| Tabela 32: Comparação dos valores de CIM de antifúngicos para amostras de <i>P. brasiliensis</i> parentais e subpopulações selecionadas em sulfametoxazol, determinados em caldo RPMI, a 37°C, 15 dias de incubação .....          | 102 |
| Tabela 33: Condições empregadas em estudos anteriores e no presente trabalho para determinação de CIM contra o complexo de espécies de <i>Paracoccidioides</i> : um protocolo provisório baseado em nossos resultados atuais ..... | 128 |

## Lista de Abreviaturas

% - por cento

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – sulfato de amônio

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – heptamolibidato de amônio tetra-hidratado

~ - aproximadamente

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – cloreto de cálcio di-hidratado

Céls – células

CIM – concentração inibitória mínima

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – sulfato de cobre penta-hidratado

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

DTT \_ dithiothreitol

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – sulfato de amônio ferroso hexa-hidratado

g – grama

h – hora

$\text{H}_2\text{O}$  – água

$\text{H}_3\text{BO}_3$  – ácido bórico

K – potássio

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  – fosfato de potássio

L – levedura

M – micélio

Mb – megabase

mg – miligrama

mgeo – média geométrica

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – sulfato de magnésio sete vezes hidratado

MH – Mueller Hinton

MHM – Mueller Hinton modificado

Min. – minutos

mL – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

$\text{MnSO}_4 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$  – sulfato de manganês quatorze vezes hidratado

Mp – múltiplos passos

MS – espectrometria de massas

MVM – Mcveigh & Morton

N – normal

NaOH – hidróxido de sódio

nm – nanômetro

°C – graus Celsius

PCM – paracoccidioidomicose

PFGE – gel de eletroforese de campo pulsado

pH – potencial hidrogeniônico

Pu – passo único

RPM – rotações por minuto

SDS – sódio dodecil sulfato

seg. – segundo

TA – Temperatura ambiente

TAE – tris-acetado EDTA

TE – Tris-EDTA

UV – ultravioleta

V – volts

YPD – “yeast peptone dextrose” (meio contendo extrato de levedura, peptona e glicose)

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – sulfato de zinco hepta-hidratado

µg – micrograma

µm – micrômetro



## Sumário

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Relevância e Justificativa</b> .....   | 20 |
| <b>2. Revisão da Literatura</b> .....  | 23 |
| 2.1 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> : características gerais e taxonômicas .....  | 24 |
| 2.2 Paracoccidioidomicose – PCM .....  | 32 |
| 2.3 Drogas antifúngicas no tratamento da PCM .....   | 34 |
| 2.3.1 Polienos .....   | 35 |
| 2.3.2 Azólicos .....   | 35 |
| 2.3.3 Derivados sulfamídicos .....   | 36 |
| 2.3.4 Análogos de pirimidina .....   | 36 |
| 2.3.5 Equinocandinas .....   | 37 |
| 2.3.6 Alilaminas, tiocarbamatos e morfolinás .....   | 37 |
| 2.4 Determinação de concentração inibitória mínima de antimicrobianos e susceptibilidade <i>in vitro</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ..... | 39 |
| 2.5 Aspectos relacionados à resistência aos antimicrobianos em fungos .....  | 42 |
| 2.5.1 Alteração no transporte - bomba de efluxo .....  | 42 |
| 2.5.2 Alteração do sítio alvo .....  | 43 |
| 2.5.3 Utilização de vias compensatórias .....  | 45 |
| <b>3. Objetivos</b> .....  | 47 |
| 3.1 Objetivo geral .....   | 48 |
| 3.2 Objetivos específicos .....  | 48 |
| <b>4. Material e Métodos</b> .....   | 50 |
| 4.1 Microrganismos .....   | 51 |
| 4.2 Manutenção e cultivo das amostras .....  | 51 |
| 4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de antimicrobianos frente a amostras de <i>P. brasiliensis</i> .....                          | 53 |
| 4.3.1 Preparo de meios de cultura para os ensaios de CIM .....   | 53 |
| 4.3.2 Antimicrobianos utilizados .....   | 54 |
| 4.3.3 Diluição dos antimicrobianos .....   | 54 |
| 4.3.4 Padronização do inóculo .....  | 55 |
| 4.3.5 Protocolo experimental adotado para determinações de CIM ....  | 55 |
| 4.3.6 Leitura e interpretação dos resultados de determinação de CIM .....  | 56 |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 4.3.7     | Determinação da CIM por MTT .....   | 57        |
| 4.3.8     | Ensaio de CIM utilizando método de diluição em ágar .....   | 58        |
| 4.3.9     | Observação da morfologia de <i>P. brasiliensis</i> .....  | 58        |
| 4.4       | Análises da atividade fungicida ou fungistática dos antimicrobianos frente a <i>P. brasiliensis</i> .....           | 58        |
| 4.5       | Análises estatísticas .....   | 59        |
| 4.6       | Seleções de subpopulações de <i>P. brasiliensis</i> em concentrações crescentes de antifúngicos .....               | 59        |
| 4.6.1     | Escolha do meio de cultura para o ensaio de seleção de subpopulações de <i>P. brasiliensis</i> .....                | 59        |
| 4.6.2     | Ensaio de seleção de subpopulações de <i>P. brasiliensis</i> menos susceptíveis ou resistentes a antifúngicos ..... | 60        |
| 4.7       | Avaliação da estabilidade da resistência aos antimicrobianos .....  | 61        |
| 4.8       | Extração de DNA genômico de <i>P. brasiliensis</i> .....  | 62        |
| 4.9       | Confirmação da identidade de clones de <i>P. brasiliensis</i> .....   | 63        |
| 4.10      | Preparo de extrato protéico de amostras parentais e de subpopulações selecionadas de <i>P. brasiliensis</i> .....   | 65        |
| 4.11      | Resolução eletroforética de extratos protéicos das amostras de <i>P. brasiliensis</i> em SDS-PAGE .....             | 66        |
| 4.12      | Resolução dos extratos protéicos das amostras de <i>P. brasiliensis</i> em eletroforese bidimensional (2-DE) .....  | 66        |
| <b>5.</b> | <b>Resultados</b> .....   | <b>68</b> |
| 5.1       | Avaliação das condições experimentais para a execução de ensaios de determinação de CIM por microdiluição .....     | 69        |
| 5.2       | Determinação de CIM em caldo RPMI .....   | 70        |
| 5.3       | Observação da morfologia de amostras de <i>P. brasiliensis</i> em diferentes meios de cultura .....                 | 74        |
| 5.4       | Determinação de CIM em caldo MHM .....  | 76        |
| 5.5       | Determinação de CIM em caldo MVM .....  | 78        |
| 5.6       | Efeitos da adição de MTT nas determinações de CIM .....   | 81        |
| 5.7       | Análises da ação fungicida ou fungistática dos antimicrobianos durante o ensaio de determinação de CIM .....        | 81        |
| 5.8       | Determinações de CIM por incorporação em ágar RPMI .....  | 86        |

|  |            |
|--|------------|
| 5.9 Seleção de subpopulações de <i>P. brasiliensis</i> em concentrações crescentes de antifúngicos .....                     | 91         |
| 5.9.1 Escolha dos antifúngicos e de amostras de <i>P. brasiliensis</i> .....   | 91         |
| 5.9.2 Escolha do meio de cultura para o ensaio de seleção .....  | 91         |
| 5.9.3 Seleção de subpopulações de <i>P. brasiliensis</i> a 37°C, tolerantes a concentrações crescentes de antifúngicos ..... | 95         |
| 5.9.4 Seleção de subpopulações de <i>P. brasiliensis</i> atípicas para o dimorfismo térmico .....                            | 101        |
| 5.10 Análise preliminar da expressão diferencial de proteínas do clone BCL1 por 2-DE .....                                   | 109        |
| <b>6. Discussão</b> .....  | <b>113</b> |
| 6.1 Determinação de CIM de antifúngicos frente a <i>P. brasiliensis</i> por microdiluição em placas .....                    | 115        |
| 6.2 Seleção de subpopulações de <i>P. brasiliensis</i> resistentes a antifúngicos .....                                      | 128        |
| <b>7. Conclusões e Perspectivas</b> .....  | <b>135</b> |
| <b>8. Referências Bibliográficas</b> .....   | <b>138</b> |
| <b>9. Anexos</b> .....   | <b>157</b> |
| <b>10. Relação da Produção Científica</b> .....  | <b>191</b> |

# 1. Relevância e Justificativa

*Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), é um fungo mitospórico, termodimórfico, que cresce na forma micelial à temperatura ambiente e leveduriforme quando cultivado a 37°C.

A PCM é uma doença sistêmica granulomatosa, endêmica e prevalente na América Latina, que representa, no Brasil, a principal causa de morte entre as micoses sistêmicas, superando inclusive as micoses oportunistas. Ocupa a oitava posição entre as causas de mortalidade por doença crônica ou repetitiva, entre as doenças infecciosas e parasitárias, com uma taxa de 1,45/ milhão de habitantes/ ano. A doença não é de notificação compulsória e tem alto potencial incapacitante, atingindo principalmente trabalhadores rurais, que apresentam dificuldade de acesso e/ou suporte dos serviços públicos de saúde, levando muitas vezes ao diagnóstico tardio e conseqüente morte prematura. Desta forma a PCM caracteriza-se como importante problema de saúde pública.

A patogênese da doença está diretamente relacionada à transição dimórfica de micélio para a levedura. A forma de levedura permite a sobrevivência do *P. brasiliensis* a 37°C (temperatura média do corpo humano) sendo assim, importante alvo para estudos.

As drogas mais comumente empregadas no tratamento da PCM são: anfotericina B, os derivados azólicos (cetoconazol, fluconazol e itraconazol) e sulfamídicos (sulfametoxazol/trimetoprim). O tratamento é usualmente prolongado, demonstrando a dificuldade de eliminação do patógeno dos tecidos do hospedeiro, e emprega doses elevadas dos antimicrobianos. A prolongada duração do tratamento visa permitir o controle das manifestações clínicas da micose buscando a melhora clínica, recidivas e, eventualmente alcançar a cura. No entanto, as recidivas são frequentes. Muitas vezes, não há uma boa adesão do paciente à terapêutica, sendo frequente que descontinue o uso da medicação. Ocorre ainda, a dificuldade da decisão dos clínicos quanto ao momento ideal para a suspensão do tratamento, pois os critérios de cura são tanto clínicos, quanto radiológicos e imunológicos, tornando complexo o monitoramento da atividade da doença e difícil o atendimento a todos os parâmetros propostos.

A resistência antimicrobiana em fungos pode ser classificada como primária ou intrínseca, quando a resistência está presente antes da exposição ao antimicrobiano, ou como secundária ou adquirida, quando ocorre após a exposição ao antimicrobiano. Diferentes mecanismos de resistência são encontrados nos fungos, dentre os quais podemos destacar: uma elevação nos níveis de expressão de alvos celulares, aumento do efluxo promovido por alterações nos genes reguladores dos sistemas de transporte; inativação ou degradação enzimática da droga antimicrobiana, alteração do sítio-alvo ou da enzima-alvo dos antimicrobianos, com diminuição da afinidade da droga. Os fungos podem, ainda, exibir fenótipo de resistência cruzada a vários antimicrobianos, frequentemente associado com a expressão de genes de transporte.

Estudos relativos à susceptibilidade de isolados clínicos e ambientais de *P. brasiliensis* a diferentes antimicrobianos, por determinação da concentração inibitória mínima (CIM), têm indicado que o fungo é, em geral, susceptível à maioria dos antifúngicos testados. Por outro lado, há trabalhos indicando a ocorrência de resistência *in vitro* a sulfamídicos e a ocorrência de resistência clínica, muitas vezes sem correspondência com a aparente susceptibilidade *in vitro* do fungo aos antimicrobianos. No entanto, não existe na literatura, um protocolo padronizado para ensaios de determinação de CIM para *P. brasiliensis* por microdiluição, a 37°C ou a temperatura ambiente, como ocorre para outros fungos leveduriformes ou filamentosos.

A seleção de subpopulações de *P. brasiliensis* progressivamente menos susceptíveis, ou resistentes, aos antifúngicos usualmente empregados na terapêutica da PCM pode permitir estudar e conhecer as principais moléculas envolvidas no processo e ampliar o conhecimento sobre alguns mecanismos de resistência nas linhagens selecionadas, passíveis de ocorrerem naturalmente durante a vigência do tratamento.

## 2. Revisão da Literatura

## 2.1 *Paracoccidioides brasiliensis*: características gerais e taxonômicas

O fungo dimórfico *P. brasiliensis* foi primeiramente descrito em 1908, pelo pesquisador brasileiro Dr. Adolfo Lutz, em São Paulo, que o isolou de uma lesão em cavidade oral, observando leveduras que apresentavam múltiplos brotamentos. Posteriormente, Splendore denominou o fungo *Zymonema brasiliensis* e, entre 1927 e 1930, Floriano de Almeida, após uma melhor caracterização do microrganismo, propôs a denominação *Paracoccidioides brasiliensis* (BETHIEM et al., 1999).

Apesar de a sua fase teleomórfica, ou perfeita, não ser ainda conhecida, análises morfológicas em conjunto com análises moleculares demonstraram que *P. brasiliensis* pertence ao filo Ascomycota, ordem Onygenales e família Onygenaceae, mesmo grupo de outros fungos dimórficos patogênicos como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum* (BAGAGLI, et al., 2006).

Estudos de filogenia molecular em fungos baseiam-se, entre outras abordagens, em análises por sequenciamento, alinhamento e comparação de sequências de genes, entre os quais se destacam as dos RNA ribossômicos (rRNAs) e seus moldes correspondentes (rDNAs). Uma região pequena e altamente conservada como o *locus* rDNA 5,8S pode oferecer informações evolucionárias de organismos filogeneticamente distantes, enquanto outros *loci* de rDNA como o da subunidade maior e mais heterogênea (LSU, 28S rDNA) e da subunidade menor (SSU, 18S rDNA) podem permitir a distinção entre espécies do mesmo gênero ou linhagens da mesma espécie (SAN-BLAS et al., 2002). Um clado distinto originado de Onygenaceae foi proposto como uma nova família (*Ajjelomycetaceae*), para incluir o grupo monofilético *Ajellomyces*, que inclui os gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (UNTEREINER et al., 2004), ficando a classificação atual de *P. brasiliensis* como descrito a seguir (BAGAGLI, et al., 2008).

Divisão – Eukaryota

Reino – Fungi

Filo – Ascomycota

Classe - Eurotiomycetes



Ordem – Onygenales

Família – *Ajellomycetaceae*

Gênero – *Paracoccidioides*

Espécie – *Paracoccidioides brasiliensis*

O fungo *P. brasiliensis* pode crescer em ágar Sabouraud à temperatura ambiente (25°C a 28°C) produzindo colônias brancas que crescem aderidas o meio de cultura. Seu crescimento micelial (fase M) é lento podendo atingir um máximo em 20 a 30 dias após o inóculo. Quando vistas ao microscópio óptico, as colônias apresentam filamentos finos, septados, com clamidospóros terminais ou intercalares. Quando *P. brasiliensis* é cultivado a uma temperatura de 35 a 37°C, apresenta colônias com aspecto rugoso, maleável, de coloração creme e morfologia microscópica leveduriforme (fase L), com células de tamanhos variáveis medindo cerca de 2 a 30 µm de diâmetro. Seu padrão de brotamento é múltiplo, produzindo diversas células-filhas (2 a 5 µm de diâmetro) que ficam aderidas à superfície da célula-mãe (30 a 40 µm), o que confere ao *P. brasiliensis* o aspecto característico de “roda de leme” (BRUMMER *et al.*, 1993; LACAZ, 1994).

Quando amostras de *P. brasiliensis* são cultivadas em condições de estresse como, por exemplo, privação de água ou nutrientes, podem originar propágulos ou conídios. Esses conídios podem exibir o dimorfismo característico do fungo dando origem diretamente à fase M ou fase L, de acordo com a temperatura de cultivo (BRUMMER *et al.*, 1993).

As evidências indicam, até o momento, que a temperatura parece ser um fator crítico que interfere na conversão da fase M para L em *P. brasiliensis* (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1994) e sua patogenicidade parece estar associada à transição dimórfica, uma vez que linhagens incapazes de se transformarem em leveduras não são virulentas (TOLEDO *et al.*, 1999; GOLDMAN *et al.*, 2003). Além da temperatura, sais parecem ter influencia na transição dimórfica. Vallejo e colaboradores (FERREIRA *et al.*, 2006), observaram que *P. brasiliensis* é prototrófico para enxofre quando encontra-se na fase micelial e incapaz de assimilar enxofre inorgânico quando encontra-se na forma de levedura, observando ainda que o enxofre assim como a temperatura é

necessário para o início da transição de micélio para levedura mas desnecessário para a manutenção do crescimento leveduriforme.

As mudanças morfológicas em *P. brasiliensis* são acompanhadas de reorganização dos lipídios da membrana, alterações na composição da parede celular, com aumento na quantidade de quitina e mudança do polímero glucana predominante, que passa de  $\beta$ -1,3-glucana (no micélio) para  $\alpha$ -1,3 glucana (na levedura) (SAN-BLAS & NIÑO-VEGA, 2001). Os trabalhos sobre a transição dimórfica em *P. brasiliensis* realizaram análises do transcriptoma nas formas M e L, indicando que as alterações celulares são mais complexas e extensas, envolvendo a expressão diferencial de numerosos genes, pertencentes a várias categorias funcionais e diversas vias metabólicas distintas (FELIPE et al., 2003; GOLDMAN et al., 2003; MARQUES et al., 2004, SILVA et al., 2008).

Alguns componentes estruturais ou funcionais de fungos podem auxiliar na sua patogênese e são muitas vezes referidos como fatores de virulência (KUROKAWA et al., 1998). Componentes da parede celular como  $\alpha$ -glucanas, moléculas de adesão e enzimas (proteínases, lipases e fosfolipases) considerados importantes para a nutrição e invasão de tecidos animais por fungos são também observados em *P. brasiliensis* (BAGAGLI et al., 2008). Verificou-se que a fosfolipase B, enzima ubíqua em envolvida em diferentes processos biológicos como homeostasia da membrana, aquisição de nutrientes e geração de moléculas bioativas, é considerada um fator de virulência importante na adesão e internalização do fungo em macrófagos alveolares (SOARES et al., 2010). Vallejo e colaboradores (VALLEJO et al., 2011) observaram recentemente a presença de vesículas extracelulares em *P. brasiliensis* relacionadas com exportação de fatores de virulência como o antígeno  $\alpha$ -galactosil. A temperatura de muitos vertebrados é considerada alta (37°C), sendo a endotermia um fator de proteção contra doenças infecciosas, em especial àquelas causadas por fungos que crescem a temperaturas mais baixas (25-28°C) (BAGAGLI et al., 2008). A termotolerância observada no dimorfismo de *P. brasiliensis*, portanto, também pode ser considerada um fator de virulência. A melanina é um polímero multifuncional encontrado em diversas espécies do reino animal e também foi previamente relatada como fator de virulência (NOSANCHUK & CASADEVALL, 2003). É uma molécula

negativamente carregada, hidrofóbica, de alto peso molecular, tipicamente preta ou marrom; insolúvel em compostos aquosos e orgânicos, resistente a ácidos concentrados, susceptíveis ao branqueamento por agentes oxidantes e por isso de difícil estudo (PLONKA & GRABACKA, 2006). A melanina é amplamente estudada em *Cryptococcus neoformans*, relatando-se que confere a esse patógeno resistência a antimicrobianos, principalmente anfotericina B e caspofungina, por alteração da permeabilidade da parede celular, além de maior tolerância à radiação UV, agentes oxidantes e proteção contra células de defesa do hospedeiro. Um estudo relacionado à variabilidade do comportamento de *P. brasiliensis* em resposta a drogas antifúngicas foi apresentado por Silva e colaboradores: células leveduriformes “melanizadas” da amostra Pb18 não demonstraram diferenças significativas nos valores de concentração inibitória mínima (CIM) para os antimicrobianos testados quando os valores obtidos foram comparados com aqueles encontrados para células não-melanizadas, do mesmo isolado. No entanto, a melanização promoveu uma significativa sobrevivência dessas células frente a todos os antimicrobianos utilizados (anfotericina B, cetoconazol, fluconazol, itraconazol e sulfametoxazol/trimetoprim) em especial anfotericina B e cetoconazol, indicando que a melanina parece exercer um importante papel na resistência a antimicrobianos em *P. brasiliensis* (da SILVA et al., 2006).

Quanto à ecologia de *P. brasiliensis*, pouco ainda se conhece. Sabe-se que o habitat do fungo é exógeno ao ser humano, porém o local ocupado pelo fungo e os elos que permitiriam relacionar o fungo ao homem permanecem pouco esclarecidos (BRUMMER et al., 1993). Acredita-se que o fungo habite regiões úmidas como solos de florestas tropicais ou subtropicais, ou vegetais, onde as variações de temperatura são mínimas. O fungo estaria presente na forma de micélio, produzindo conídios capazes de dispersão aérea e viveria saprofiticamente (BRUMMER et al., 1993; BAGAGLI et al., 2008).

Embora não seja frequente isolar *P. brasiliensis* em ambientes naturais, há relatos de isolamento do solo (MONTENEGRO et al., 1996, SILVA-VERGARA et al., 1998). Ferreira e colaboradores (FERREIRA et al., 1990) isolaram *P. brasiliensis* proveniente de ração de cachorro, provavelmente contaminada com solo. Relatou-se um isolamento do fungo a partir de fezes de pinguim na Antártica (GEZUELE, 1989). Vários autores relataram o isolamento

a partir de tecidos de tatus de nove-bandas (*Dasypus novemcinctus*) (NAIF et al., 1986; NAIF et al., 1989; BAGAGLI et al., 1998; MACEDO et al., 1998; SILVA-VERGARA et al., 1998; CORREDOR et al., 1999; BAGAGLI et al., 2003), considerado um hospedeiro não-humano. Corredor e colaboradores (CORREDOR et al., 2005) isolaram o fungo de uma outra espécie de tatu (*Cabassous centralis*). A presença de *P. brasiliensis* proveniente de amostras de solo e de tatu foi confirmada em nível molecular por meio de *nested* PCR espécie-específica, baseada na amplificação de regiões de ITS5-, 8S-ITS2 (BAGAGLI et al., 2008).

Destaca-se, o relato da ocorrência da paracoccidiodomicose (PCM) em cães, como o isolamento de uma amostra de animal, uma fêmea de Dobermann que apresentava um quadro de linfadenomegalia (RICCI et al., 2004). Esse isolado foi caracterizado por cultura, por sequenciamento de amplicons do gene GP43, que codifica uma glicoproteína exocelular, componente antigênico majoritário e específico do fungo, e da região 5,8S rDNA (BOSCO et al., 2005). Em um estudo envolvendo 149 cães provenientes da zona urbana e 126 cães provenientes da zona rural da cidade de Uberaba – MG, considerada zona endêmica de paracoccidiodomicose, detectou-se reatividade sorológica positiva para o antígeno Gp43 do fungo, considerado espécie-específico. Observou-se positividade de 50,3% em cães da zona urbana e 80,9% em cães da zona rural o que indica maior exposição aos propágulos fúngicos na região rural que na urbana (FONTANA et al., 2009). Outra contribuição recente à soropidemiologia da PCM encontra-se num estudo que objetivou detectar a infecção em grupos de frangos que vivem livremente no solo, provenientes do Mato Grosso do Sul, e frangos engaiolados, provenientes do Paraná, que não teriam um contado direto com o solo. Observou-se positividade mais alta em frangos livres (55%) que em frangos engaiolados (16%), o que reforça a idéia de que o solo possa ser o ambiente onde o contato com o fungo seja maior (OLIVEIRA et al., 2010). Recentemente, relatou-se a primeira descrição da PCM num felino (GONZALES et al., 2010) e o achado de células características do fungo em *Choloepus didactylus* (bicho preguiça) em amostras de pulmão, fígado e baço (CHAVEZ et al., 2011). Registrou-se ainda, o segundo caso de PCM em cães (fêmea de Doberman) no Paraná (de FARIAS et al., 2011). Observa-se que a

provável ocorrência de infecção pelo fungo em animais silvestres foi previamente assinalada por Richini-Pereira e colaboradores (RICHINI-PEREIRA et al., 2009), que empregando abordagem molecular, detectou a sua presença em carcaças de animais mortos coletadas em rodovias de uma região endêmica (BAGAGLI et al., 2008).

A partir da aplicação de técnicas que permitiram a caracterização genética do fungo, como por exemplo, amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) (SOARES et al. 1995), as análises de polimorfismos de tamanho de fragmentos gerados por endonucleases de restrição (RFLP) (NIÑO-VEGA et al., 1998), eletroforese de campo pulsado (PFGE) (CANO et al., 1998) delinear-se os primeiros estudos sobre diferenças populacionais e de organização genética do fungo. As ferramentas de análise molecular mais recentemente aplicadas no seu estudo relacionam-se à genômica e proteômica com projetos envolvendo proteoma (FONSECA et al., 2001) e transcriptoma (FELIPE et al., 2003; GOLDMAN et al., 2003) os tem contribuído para a rápida expansão do conhecimento sobre a composição, organização e regulação da expressão gênica em *P. brasiliensis* (SAN-BLAS et al., 2002). A forma sexuada de *P. brasiliensis* ainda não é conhecida, contudo, o recente sequenciamento genômico publicado pelo Broad Institute ([www.Broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/multihome.html](http://www.Broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/multihome.html)) trouxe evidências da ocorrência de recombinação sexuada e revelou a existência de *loci* “mating type”, sucessivamente caracterizados (MATUTE et al 2006; TORRES et al., 2010; LI et al., 2010), cuja presença indica um potencial para a realização de experimentos envolvendo genética clássica, cruzamentos e seleção estudos de recombinantes.

*P. brasiliensis* revelou-se multinucleado, inclusive na forma de levedura, relatando-se a presença de 4 a 6 núcleos por célula e, apenas nos conídios, a observação de um único núcleo por célula (McEWEN et al., 1987). Em diferentes amostras do fungo, foi possível observar 4 ou 5 cromossomos que variam em tamanho molecular (2 a 10 Mb), demonstrando, portanto, a ocorrência de polimorfismo de número e tamanho de bandas cromossômicas (CANO et al., 1998; SAN-BLAS et al., 2002). Quanto à ploidia, a cariotipagem de amostras clínicas e ambientais revelou variações intraespecíficas e a fluorimetria de núcleos corados por DAPI, em microscopia confocal, sugeriu a

existência de linhagens diplóides e haplóides, ou aneuplóides (FEITOSA, et al., 2003). Contudo, Almeida e colaboradores (ALMEIDA et al., 2007) estudando o tamanho do genoma e a ploidia em 10 isolados clínicos e ambientais por citometria de fluxo e pela análise da variabilidade do gene GP43, não observaram variações de conteúdo de DNA nuclear que indicassem variações de ploidia e encontraram um único alelo do gene GP43 em cada indivíduo, resultados que contradizem os anteriores e são indicativos de um genoma haplóide ou aneuplóide.

Em 2003, dois grupos de pesquisadores brasileiros comunicaram, independentemente, a adoção da estratégia de geração de etiquetas de sequências expressas (ESTs) como ferramentas para estudos genômicos em *P. brasiliensis* (FELIPE et al., 2003; GOLDMAN et al., 2003), as quais entre outros achados, indicaram um conjunto entre 7500 a 9000 genes. Sucessivamente, análises comparativas de sequências por meio do programa BLAST revelaram que 68,5% dos genes de *P. brasiliensis* são relacionados com genes de outros fungos e que 52,9% desses são ortólogos de *Aspergillus nidulans*, o que reflete uma relação filogenética. Um percentual de 30,2% dos genes foi exclusivo de *P. brasiliensis*. Dos grupos funcionais classificados, 29% dos genes relacionaram-se com metabolismo celular, 12% com a maquinaria de transcrição, 10% a síntese de proteínas, 9% envolvidos com produção de energia e 4% com controle de organização celular. Aproximadamente 4% dos genes analisados parecem ter envolvimento com a transdução de sinais e vias de comunicação celular relacionadas à diferenciação dimórfica (FELIPE, et al., 2005 (b)).

Como há evidências de que a transição dimórfica estaria relacionada ao processo de infectividade do fungo, há interesse em estudar se há expressão gênica diferencial entre as formas filamentosa e de levedura. Assim, Marques e colaboradores analisando a expressão gênica em meios mínimo e completo, verificaram que 20 genes possuíam maior expressão na levedura que no micélio, incluindo o gene *AGS1*, que codifica  $\alpha$ -1,3-glucana sintetase cujo produto, as  $\alpha$ -1,3-glucanas, está presente preferencialmente nas paredes celulares das formas L (MARQUES et al., 2004). Nunes e colaboradores verificaram que o gene 4-HPPD (que codifica 4-hidroxil-fenil piruvato dioxigenase) enzima envolvida no catabolismo de fenilalanina e tirosina, é

altamente expresso durante a transição de micélio para levedura. O produto desse gene é fortemente inibido por NTBC (2-2-nitro-4-fluorometilbenzoil-ciclohexano-1,3-diodo), substância que impediu a transição de micélio para levedura em *P. brasiliensis*, sugerindo que o produto deste gene pode ser um alvo interessante para a terapêutica (NUNES et al., 2005).

A aplicação de técnicas moleculares para compreensão da filogenia vem contribuindo para a revisão da taxonomia e nomenclatura, admitindo-se atualmente a existência de mais de uma espécie no gênero *Paracoccidioides*. Matute e colaboradores (MATUTE et al., 2006), analisando oito regiões de cinco genes altamente conservados: quitina sintetase,  $\beta$ -glucano sintetase,  $\alpha$ -tubulina, fator de adenilribosilação e GP43 e também análise de microsatélites de 65 isolados de *P. brasiliensis*, revelou a existência de três espécies filogenéticas distintas. A espécie chamada S1 proveniente do Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela; a espécie filogenética PS2 do Brasil e Venezuela e a espécie filogenética PS3 proveniente da Colômbia. Foi observado que S1 e PS2 são espécies simpátricas e recombinantes enquanto a espécie PS3 mostrou-se alopátrica e clonal (MATUTE et al., 2006, BAGAGLI et al., 2008). O tempo de divergência entre PS2-PS3 foi estimado em 8,04 - 8,39 milhões de anos, o que sugere especiação, sendo PS3 geograficamente restrita a Colômbia (MATUTE et al., 2007).

Análises filogenéticas envolvendo 21 *loci* polimórficos em 21 amostras de *P. brasiliensis* revelaram uma amostra atípica, a Pb01, que se mostrou altamente divergente em relação às outras e claramente distante das três espécies filogenéticas previamente descritas (CARRERO et al., 2008). Estudos envolvendo análise de estimativa de divergência evolutiva baseada em regiões conservadas do gene HSP70 e características morfológicas (células leveduriformes maiores e com brotamento abundante) de Pb01 e outras 49 amostras de *P. brasiliensis*, permitiram agrupar as amostras que exibiram perfil semelhante a Pb01 como “Pb01-like” (TEIXEIRA et al., 2009). O conjunto dessas análises, bem como a possibilidade de um longo período de isolamento genético, levaram os autores a propor que a amostra Pb01 e aquelas denominadas “Pb01-like” são uma nova espécie do gênero *Paracoccidioides*. Os autores propuseram ainda a denominação de *Paracoccidioides lutzii* para

essa nova espécie, embora ainda não esteja consolidado (TEIXEIRA et al., 2009).

## **2.2 Paracoccidioidomicose - PCM**

A paracoccidioidomicose é uma doença restrita à América Latina sendo o Brasil, o país com o maior número de casos relatados, cerca de 80%. Dados recentes da mortalidade no período de 1996-2006 revelaram que a PCM a principal causa de morte por micose sistêmica no Brasil, ficando à frente inclusive de micoses oportunistas como a criptococose, a candidíase e a aspergilose (PRADO et al., 2009). Há registros da doença na Colômbia, Venezuela e Argentina cuja ocorrência não é homogênea nas áreas endêmicas. A doença possui distribuição limitada, de 23°N (sul do México) a 34,5°S (Argentina e Uruguai). As áreas endêmicas apresentam temperaturas e precipitações moderadas (17-24° C; 900-1800 mm/ano), presença de florestas tropicais ou subtropicais, invernos curtos e verões chuvosos (RESTREPO et al., 1984; BRUMMER et al., 1993).

A paracoccidiomicose (PCM) apresenta duas formas clínicas progressivas: forma aguda (subaguda ou juvenil) e a forma crônica que acomete adulto e pode ser subdividida em unifocal ou multifocal. Ambas as formas estão associadas com inflamação granulomatosa, supressão da imunidade celular e uma elevada produção de anticorpos (BRUMMER et al., 1993).

A forma juvenil da doença representa cerca de 3 a 5% dos casos, caracterizando-se por uma rápida evolução (cerca de semanas ou meses) e pelo envolvimento do sistema retículo-endotelial com disseminação pelo sistema linfático e pelo sangue, hipertrofia do fígado, linfonodos e medula óssea. Com frequência pode ocorrer desordem linfoproliferativa ou septicemia (NEGRONI, 1994; MONTENEGRO & FRANCO, 1994, RAMOS-e-Silva & SARAIVA, 2008).

A forma adulta ocorre em mais de 90% dos pacientes. Nestes casos a doença progride lentamente podendo levar vários meses ou anos até seu estabelecimento. Diferentemente do que ocorre no tipo juvenil, manifestações pulmonares estão evidentes em 90% dos adultos e em aproximadamente 25%



dos casos os pulmões são o único órgão clinicamente afetado (forma unifocal). Os sintomas respiratórios não são específicos e incluem tosse, expectoração, dificuldade respiratória, perda de peso febre e anorexia. Nas formas multifocais, os sintomas são variados e estão presentes em vários órgãos e sistemas. Com muita frequência, as lesões podem ocorrer na mucosa nasal e oral, linfonodos, glândulas adrenais e pele (BRUMMER et al., 1993; WALMSLEY et al., 2002; SILVA & SARAIVA, 2008; FERREIRA, 2009).

O controle imunológico da PCM depende da via de resposta imune celular do tipo Th1 caracterizada pela produção de interleucinas 2 e 12 (IL2 e IL12) e interferon gama (IFN $\gamma$ ) que ativam macrófagos e linfócitos resultando na formação de granulomas. Pacientes que desenvolvem a doença exibem uma inibição da resposta do tipo Th1 e predominância da resposta do tipo Th2, com ativação linfócitos B e altos títulos de anticorpos. Nas formas aguda e crônica disseminada da PCM os pacientes exibem níveis elevados de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (principalmente IL1 e IL6) e altos níveis de anticorpos, porém, com uma taxa normal de IL4, percebendo-se então, a predominância da via de resposta Th2 em formas aguda e/ou crônica disseminada e, por outro lado, a vigência de resposta mediada pela via Th1 em casos de doença mais restrita ou benigna (SILVA & SARAIVA, 2008; FERREIRA, 2009).

A PCM não é transmitida de pessoa para pessoa e a maioria dos pacientes (cerca de 70%) é proveniente de zonas rurais, porém há relatos de sua manifestação em indivíduos urbanos que teriam pouco contato com o solo. A doença é mais frequente em homens do que em mulheres. Estudos revelam que a infecção, subclínica, parece ocorrer igualmente em homens e mulheres, mas o desenvolvimento da doença é mais comum em homens, havendo fortes evidências, inclusive experimentais de que fatores hormonais poderiam ter participação na patobiologia da doença (RESTREPO et al., 1984; BRUMMER et al., 1994; COUTINHO et al., 2002). Restrepo e colaboradores (Restrepo et al. 1984) mostraram que o *P. brasiliensis* tem receptores para o 17- $\beta$ -estradiol no citoplasma. Aristizabal e colaboradores (ARIZTIZABAL et al., 1998) demonstraram, *in vivo*, que hormônios femininos (estrógeno) são capazes de bloquear a transição da fase M para a fase L e seriam potencialmente

responsáveis por uma eventual maior resistência das mulheres à doença. Recentemente, Pinzan e colaboradores demonstraram através de estudos envolvendo camundongos machos e fêmeas, que a influência do sexo gerado nos modelos experimentais de PCM é em parte atribuída pela interferência do hormônio sexual na resposta imune induzida por *P. brasiliensis*. Também, a paracoccidioidina (antígeno presente na superfície celular ligada a quitina) ativa a resposta imune inata, tornando as fêmeas mais resistentes a infecção, uma vez que a resposta imune tipo Th2 é mais observada em machos (PINZAN et al., 2010).

Quanto ao diagnóstico laboratorial da PCM, os procedimentos micológicos baseiam-se tanto na visualização das leveduras características de *P. brasiliensis* em amostras biológicas (raspados de lesão ou secreções de escarro; pus ou biópsia de tecidos mucocutâneos) (padrão ouro) quanto no cultivo do fungo a partir de espécimes clínicos seguido de identificação morfofisiológica e/ou molecular. Os exames sorológicos também são uma importante ferramenta no diagnóstico, bem como no estabelecimento dos critérios de cura da PCM e incluem: método de imunodifusão dupla (ID), contraimuno eletroforese (CIE), imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e “immunoblot” (IB). Tendo em vista a maior simplicidade, o menor custo, e a especificidade do teste principalmente quando empregam-se antígenos derivados do sobrenadante de culturas, muitas vezes ricos em gp43, a reação de ID é o principal método de diagnóstico sorológico para a PCM. O método de ELISA representa uma alternativa interessante por sua maior sensibilidade, rapidez, sendo mais apropriado para exame de grande número de soros. No entanto, apresenta menor especificidade que a ID, exigindo cuidadosa padronização e interpretação dos resultados positivos, em função da maior possibilidade de reatividade cruzada com outras micoses sistêmicas, principalmente histoplasmose (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; RAMOS-e-Silva & SARAIVA, 2008; FERREIRA, 2009).

### **2.3 Drogas antifúngicas no tratamento da PCM**

Os antifúngicos geralmente usados no tratamento de doenças causadas por fungos podem ser divididos em oito classes químicas distintas que incluem

os polienos, azólicos, derivados sulfamídicos, análogos de pirimidina, equinocandinas, alilaminas, tiocarbamatos e morfolinás.

### 2.3.1 Polienos

Os polienos pertencem a uma classe de compostos naturais de natureza alifática (uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica na molécula). Os polienos possuem como alvo o ergosterol presente na membrana celular dos fungos, ligando-se a ele. Essa ligação interrompe a integridade osmótica da membrana formando uma abertura ou poro, que compromete funções celulares, incluindo a alteração da permeabilidade da membrana, o que resulta no vazamento de potássio, magnésio, açúcares e metabólitos presentes no meio intracelular, resultando na morte da célula fúngica. Existem dois tipos de polienos mais usados na clínica: anfotericina B e nistatina. A anfotericina B é considerada padrão ouro no tratamento de doenças fúngicas principalmente quando em caráter sistêmico (BRUMMER et al., 1993; VISBAL et al., 2005, SHIKANAI-YASUDA et al., 2006, SAN-BLAS & NIÑO-VEGA, 2008; SANGLARD et al., 2009).

### 2.3.2 Azólicos

Os azólicos são compostos sintéticos divididos em duas famílias; os imidazólicos (cetoconazol) e os triazólicos (fluconazol, superconazol e itraconazol).

Os derivados azólicos atuam na via de biosíntese do ergosterol, um análogo funcional do colesterol em células animais, encontrado na membrana celular de fungos onde exerce um papel essencial na modulação da fluidez da membrana e como sinal para divisão celular (ANDERSON, 2005). A ação desses antifúngicos se dá no estágio C-14-desmetilação, terceiro passo, reação oxidativa catalizada pela enzima citocromo P-450 14 $\alpha$ -esterol desmetilase. O resultado é o rompimento e acúmulo de esteróis 14-metilados que interferem na função do ergosterol como componente de membrana, alterando a permeabilidade e a fluidez destas estruturas no fungo (BRUMMER

et al.; 1993, VISBAL et al., 2005; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; SAN-BLAS & NIÑO-VEGA, 2008; SANGLARD et al., 2009).

### 2.3.3 Derivados sulfamídicos

Os derivados sulfamídicos interferem com a síntese de ácido fólico por meio da competição com o ácido *p*-aminobenzóico (PABA), catalizada pela enzima dihidropteroato sintetase (DHPS) para produzir dihidropteroato (DHP). Como consequência, ocorre um decréscimo na síntese de folatos intracelulares, que é essencial para o crescimento do fungo (síntese de bases púricas e pirimídicas). Recentemente, mostrou-se que as drogas derivadas de sulfamídicos são metabolizadas num complexo conhecido como sulfa-DHP, um intermediário que compete com o próximo produto da via de síntese de folato, o dihidrofolato (DHF). A conversão em DHF é mediada pela enzima dihidrofolato sintetase e consiste na redução do dihidrofolato em tetrahidrofolato numa reação dependente de NADP, catalizada pela enzima dihidrofolato redutase (DHFR). Essa enzima é inibida por trimetoprim que ao lado dos derivados sulfamídicos promove um efeito de sinergia para bloquear a síntese de ácido fólico (BRUMMER et al., 1993; VISBAL et al., 2005; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; SAN-BLAS & NIÑO-VEGA, 2008).

### 2.3.4 Análogos de pirimidina

A 5-flucitocina é o único representante dessa classe de antifúngicos. Os fungos susceptíveis possuem uma enzima, a citocina desaminase, que converte a 5-flucitocina em 5-fluoruracil que é incorporado pelas moléculas de DNA e RNA, alterando a síntese dessas moléculas e a divisão celular. A 5-flucitocina é comumente utilizada em combinação com outros antifúngicos como os polienos no tratamento de doenças fúngicas devido à alta frequência no surgimento de resistência quando usada individualmente (SANGLARD et al., 2009).

### 2.3.5 Equinocandinas

As equinocandinas são a mais recente categoria de drogas antifúngicas. Elas inibem a  $\beta$ -1,3 glucana sintetase, um complexo de enzimas que está localizado na membrana plasmática de células fúngicas. Esta enzima é essencial para a síntese de  $\beta$ -1,3 glucana, um dos principais componentes da parede celular fúngica, comprometendo, assim, sua síntese e a integridade fúngica. As equinocandinas estão disponíveis em três diferentes compostos químicos: caspofungina, micafungina e anidulafungina e são usadas principalmente no tratamento de micoses invasivas (SANGLARD et al., 2009).

### 2.3.6 Alilaminas, tiocarbamatos e morfolininas

Estes compostos inibem a síntese do ergosterol em três diferentes passos. As alilaminas (terbinafina) e o tiocarbamato inibem a mesma enzima, a esqualeno epoxidase, (*Erg1*) que catalisa um passo importante para a síntese do ergosterol. As morfolininas inibem duas diferentes enzimas: *Erg2* e *Erg24*, catalizada pela enzima delta 14 redutase e delta 8-7 isomerase, respectivamente. Essas drogas têm um amplo espectro de ação contra fungos e são rotineiramente usadas como agentes tópicos no tratamento de dermatofitoses (SANGLARD et al., 2009).

O tratamento da PCM é usualmente prolongado com dosagens agressivas de agentes antimicrobianos, mantidos por meses ou até por anos, e na ausência de tratamento a doença é usualmente fatal (WALMSLEY et al., 2002). Os derivados sulfamídicos são amplamente usados na terapêutica ambulatorial da PCM, desde a descoberta da doença, principalmente por seu baixo custo e por estarem disponíveis na rede pública. Outra vantagem seria a sua toxicidade relativamente baixa. Entre os seus efeitos adversos, a leucopenia pode ser frequente, podendo ser controlada por meio do uso concomitante de ácido fólico. A combinação sulfametoxazol-trimetoprim, chamada Bactrim® tem sido descrita como capaz de eficácia do tratamento de PCM juvenil ou disseminada e pode ser ministrada por via oral (xarope) ou endovenosa. Os compostos são administrados em geral em doses de 800 a

1200 mg de sulfametoxazol e de 160 a 240 mg de trimetoprim, doses diárias para adultos, e de 40 a 50 mg de sulfametoxazol e de 8 a 10 mg de trimetoprim, em doses diárias para crianças. No entanto, requerem longos períodos de tempo para o tratamento (3 a 5 anos) podendo acarretar nefrotoxicidade; relata-se uma taxa frequente de recaídas em função de pacientes que interrompem o tratamento por se considerarem “curados” quando ocorre a amenização de sinais e sintomas da doença (VISBAL et al., 2005, SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; SAN-BLAS & NIÑO-VEGA, 2008).

A anfotericina B foi primeiramente utilizada para o tratamento da PCM, em 1958. Esse antimicrobiano é administrado de forma intravenosa em doses diárias de 1 mg/kg. É indicado para pacientes com formas graves da doença e administrado por curto período de tempo (3 a 4 meses). Como efeito colateral, a anfotericina B pode provocar nefrotoxicidade elevada e certo grau de hepatotoxicidade. (BRUMMER et al., 1993; VISBAL et al., 2005, SHIKANAI-YASUDA et al., 2006, SAN-BLAS & NIÑO-VEGA, 2008).

A introdução dos derivados azólicos representou um avanço para o tratamento da PCM. Dos derivados azólicos, o itraconazol é o mais utilizado sendo administrado em doses diárias de 200 mg para adultos e 5 a 10 mg para crianças. É indicado para tratamento durante 6 a 9 meses para formas leves e por 12 a 18 meses para as formas moderadas de PCM. O antimicrobiano cetoconazol é administrado em doses diárias de 200 mg e é indicado para tratamentos intermediários (6 meses a 1 ano). O fluconazol é ministrado em doses diárias de 100 mg e indicado para tratamentos mais curtos (3 a 6 meses). Como efeitos colaterais pode-se citar a ação teratogênica presente em todos os derivados azólicos, além de causar hepatotoxicidade em pacientes com alterações funcionais hepáticas (BRUMMER et al., 1993; VISBAL et al., 2005; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; SAN-BLAS & NIÑO-VEGA, 2008).

Devido ao fato de que os antifúngicos utilizados no tratamento de micoses promovem reações colaterais indesejadas há intensa busca por novas drogas que apresentem como alvos de ação moléculas ou estruturas que estejam presentes em fungos e ausentes de células de mamíferos. Neste contexto, as candinas como a micafungina ou caspofungina oferecem uma alternativa por atuarem na inibição da síntese de  $\beta$ -glucanas. No entanto, esses antifúngicos parecem não ter efeito sobre *P. brasiliensis* uma vez que a

atuação das candidinas depende da forma de crescimento do fungo, e *P. brasiliensis* como dimórfico apresenta  $\alpha$ -glucanas nas suas paredes, ao invés de  $\beta$ -glucanas presentes na forma L, limitando o mecanismo de ação deste antifúngico (SAN-BLAS & NIÑO-VEGA, 2008).

Os critérios para um paciente ser considerado curado da PCM são tanto clínicos, como radiológicos e imunológicos. O desaparecimento dos sinais e sintomas da doença incluindo a cicatrização das lesões tegumentares, involução das linfadenopatias e recuperação do peso corporal, estabilização do padrão das imagens cicatriciais radiológicas pulmonares e negativação dos títulos de imunodifusão dupla ou estabilização do título em valores baixos, devem ser analisados. Frequentemente podem persistir sintomas provenientes de seqüelas da PCM como respiratórias, linfático-abdominais, cutâneas, adrenais e neurológicas, sintomas estes que não representam atividade da doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

#### **2.4 Determinação de concentração inibitória mínima de antimicrobianos e susceptibilidade *in vitro* de *Paracoccidioides brasiliensis***

A susceptibilidade a antimicrobianos em fungos é comumente estimada por métodos de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), por meio dos quais se registra o crescimento na presença de concentrações crescentes do antimicrobiano, por períodos de tempo determinados, de acordo com protocolos-padrão pré-estabelecidos. A concentração inibitória mínima (CIM) do antimicrobiano é aquela que resulta em redução de 80 a 100% do crescimento, dependendo do antifúngico testado, comparado ao crescimento microbiano observado na sua ausência (controle) (ANDERSON, 2005). Para efeito de facilidade na comparação de resultados, frequentemente calcula-se as concentrações que inibem 50% e 90% do total de amostras testadas, o que configura, respectivamente, a CIM<sub>50</sub> e a CIM<sub>90</sub>.

Os valores de CIM correspondentes ao “breakpoint” (ponto de corte) são empregados com o objetivo de distinguir isolados fúngicos resistentes daqueles susceptíveis, de acordo com parâmetros que incluem observações laboratoriais *in vitro* e observações clínicas. Sendo assim, a resistência *in vitro* é caracterizada por um aumento nos valores de CIM de uma determinada

amostra de um microrganismo quando comparado com os valores medidos nas amostras controle susceptíveis às drogas. A resistência clínica, por outro lado, é compreendida como uma falha na resposta terapêutica a determinado antifúngico em um paciente infectado, mesmo quando se emprega a dosagem máxima da droga. A resistência clínica pode ser observada mesmo quando não há detecção de resistência *in vitro* ao antimicrobiano empregado (SANGLARD et al., 2009).

Em geral, para a determinação de CIM utilizam-se protocolos padrão como o “Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica de Fungos Leveduriformes” (CLSI M27-A2, 2002), desenvolvido para leveduras do gênero *Candida spp.* e *Cryptococcus neoformans*, e o “Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos” (CLSI M38-A, 2002), desenvolvido para fungos como *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* e *Sporothrix schenckii*. A determinação de CIM é essencial para verificar o perfil de sensibilidade dos diversos fungos patogênicos aos antimicrobianos, e é fundamental para embasar as definições de ponto de corte, ou seja, para caracterização de uma concentração a partir da qual as amostras de fungos de interesse possam ser reconhecidas como linhagens resistentes (ANDERSON, 2005).

Os métodos de referência descritos acima também podem ser usados para a determinação da CIM em outras espécies, além das mencionadas anteriormente, e para o *P. brasiliensis*, com algumas modificações, uma vez que não existe metodologia padronizada por laboratórios de referência para a realização de ensaios de determinação de CIM para este fungo. A escolha do antifúngico a ser testado bem como a procedência das amostras utilizadas nos ensaios de CIM varia de acordo com o objetivo do experimento. A faixa intervalar média dos valores de CIM previamente encontrados para os antimicrobianos já testados contra *P. brasiliensis* são (RESTREPO & ARANGO, 1980<sup>1</sup>; HAHN & HAMDAN, 2000<sup>2</sup>; HAHN et al., 2002<sup>3</sup>):



- 300 µg/mL para sulfametoazol/trimetoprim<sup>1</sup>;
- 0,25 µg/mL em CIM<sub>50</sub> e 0,50 µg/mL em CIM<sub>90</sub> para anfotericina B<sup>2</sup>;
- 0,00375 µg/mL em CIM<sub>50</sub> e 0,0075 µg/mL em CIM<sub>90</sub> para cetoconazol<sup>2</sup>;
- 0,25 µg/mL em CIM<sub>50</sub> e 0,50 µg/mL em CIM<sub>90</sub> para fluconazol<sup>2</sup>;
- 0,0075 µg/mL em CIM<sub>50</sub> e 0,062 µg/mL em CIM<sub>90</sub> para itraconazol<sup>2</sup>;
- 0,125 µg/mL em CIM<sub>50</sub> e 0,25 µg/mL em CIM<sub>90</sub> para terbinafina<sup>3</sup>.

Restrepo & Arango estudaram a susceptibilidade de *P. brasiliensis* à sulfonamidas e verificaram que 300 µg/mL do antimicrobiano foram capazes de inibir em 100% o crescimento das amostras (RESTREPO & ARANGO, 1980). Hahn e colaboradores (HAHN et al., 2003), analisando a correlação entre resistência clínica e susceptibilidade *in vitro* a antimicrobianos de um isolado clínico de *P. brasiliensis*, verificaram o crescimento em 320 µg/mL na combinação sulfametoxazol/trimetoprim, o que classificou o isolado como resistente. Da Silva e colaboradores, estudando o efeito da melanina na fagocitose em uma linhagem de *P. brasiliensis* (Pb18), encontrou uma CIM de 0,025 µg/mL para itraconazol (da SILVA et al., 2006).

Técnicas de macrodiluição ou microdiluição podem ser utilizadas em estudos de susceptibilidade antimicrobiana em *P. brasiliensis*. Empregando-se a macrodiluição para determinação da CIM, os efeitos da anfotericina B e de três derivados azólicos foram estudados em células leveduriformes de *P. brasiliensis* para avaliação do seu efeito na via de biossíntese de ergosterol (HAHN & HAMDAN, 2000). Esta técnica em caldo também foi usada para comparar a sensibilidade de linhagens de *P. brasiliensis* provenientes de isolados clínicos e ambientais frente aos antimicrobianos terbinafina e itraconazol (HAHN et al., 2002). É importante ressaltar que para os estudos mencionados acima, Hahn e colaboradores utilizaram o protocolo de macrodiluição de Shadomy e colaboradores (SHADOMY et al., 1987). A técnica de microdiluição também pode ser usada para detecção de CIM de antifúngicos em fungos dimórficos como *P. brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Sporothrix schenckii* onde os valores de CIM obtidos na forma L e na forma M do fungo podem ser comparados (NAKAI et al., 2003). A técnica de microdiluição também foi usada em ensaios da

atividade de extratos de plantas contra *P. brasiliensis* (JOHANN et al., 2010 (a) e (b); LIMA et al., 2010).

## **2.5 Aspectos relacionados à resistência aos antimicrobianos em fungos**

A eficácia de uma droga antifúngica pode ser medida pela sua capacidade fungicida ou fungistática, pela toxicidade ao hospedeiro e pela emergência de resistência (COWEN, 2009). A resistência a antimicrobianos pode ser classificada em primária ou intrínseca, quando está presente antes da exposição ao agente antimicrobiano e secundária ou adquirida, quando o desenvolvimento de resistência ocorre após a exposição ao antimicrobiano (KONTOYANNIS & LEWIS, 2002). Os fungos de uma maneira geral existem em populações que são adaptáveis. Sob seleção imposta por drogas antimicrobianas, patógenos sensíveis frequentemente desenvolvem resistência (COWEN, 2008). Embora exista uma quantidade significativa de informações sobre os mecanismos moleculares de resistência a antimicrobianos, esta é somente parte do caminho para se compreender a resistência. Os processos evolucionários, como mecanismos divergentes que aparecem por meio de mutações e o impacto que esses mecanismos exercem nos patógenos, e como interagem entre si e respondem a seleção natural, é o que determina de fato a ocorrência de populações de fungos resistentes à antimicrobianos (ANDERSON, 2005).

Em geral, os fungos podem adquirir resistência às drogas por mecanismos específicos como: alteração no transporte (bomba de efluxo), alteração no sítio-alvo do antifúngico e utilização de vias compensatórias.

### **2.5.1 Alteração no transporte - bomba de efluxo**

Alterações no mecanismo de transporte que podem levar ao fenótipo de resistência em fungos são mediadas por diferentes mecanismos, um deles é o aumento do efluxo promovido pela super-expressão de transportadores ABC que contém tanto sistemas de transporte de importação como de efluxo. Os transportadores ABC são geralmente compostos de dois tipos de domínios

transmembrana e dois domínios de ligação a nucleotídeo. A natureza química dos substratos utilizados pelos transportadores ABC é diversa, incluindo cadeias de íons inorgânicos, açúcares e grandes peptídeos. A super-expressão destes transportadores é, em geral, causada por uma mutação nos reguladores transcricionais e, dependendo do alvo onde ocorreu mutação, pode conferir um fenótipo de resistência. As leveduras do gênero *Candida*, especificamente *C. albicans*, são consideradas organismos modelo no estudo deste mecanismo (SAIER, 2000; SANGLARD et al., 2009, MORSCHHÄUSER, 2010).

No estudo do transcriptoma de *P. brasiliensis*, caracterizaram-se preliminarmente duas classes importantes de transportadores ABC: a superfamília de facilitadores de transporte e a de ligantes de ATP. Encontrou-se 22 grupos de sequências (contigs e singlets) anotados como transportadores ABC, relacionados às duas categorias mencionadas acima. Isto indica que transportadores ABC poderiam exercer importante papel na resistência antimicrobiana em *P. brasiliensis*. Foram encontrados também nesse estudo, genes de *P. brasiliensis* ortólogos aos de outros microrganismos (genes CDR1, CDR2 e MDR1 de *Candida albicans*; PDR4 de *Saccharomyces cerevisiae* e AtrF de *Aspergillus*) conhecidamente envolvidos na resistência a antimicrobianos. Os fungos podem exibir fenótipo de resistência cruzada a vários antimicrobianos que diferem na estrutura molecular e no alvo específico. Este fenótipo é conhecido como resistência múltipla à drogas multi-droga (MDR), e a maior parte das bombas de efluxo podem conferir o fenótipo MDR devido à grande variedade de substratos que reconhecem, incluindo várias classes de antimicrobianos (COSTA, et al., 2005).

#### 2.5.2 Alteração do sítio alvo

Outro mecanismo geral de resistência em fungos é a alteração do sítio alvo, ou seja, alterações estruturais em proteínas que levam ao impedimento no reconhecimento ou ligação do antimicrobiano ou levam á inativação alostérica do alvo após a ligação. A proteína alvo que sofreu alteração também pode, por exemplo, ser altamente expressa resultando em substancial atividade na presença do antimicrobiano. Esse mecanismo é menos frequente visto que somente poucos aminoácidos, resultantes de mutação, podem conferir um

fenótipo de resistência por ganho de função. Como alternativa, mutações que levam à perda da atividade de determinadas enzimas, podem prevenir o acúmulo do produto tóxico na presença do antimicrobiano. Este mecanismo pode ser mais frequente, visto que mudanças em vários aminoácidos resultam em perda de função podendo levar a um fenótipo de resistência (ANDERSON, 2005).

Muitos agentes antifúngicos são usados no tratamento de doenças com amplo sucesso e alguns parecem ser mais susceptíveis para o desenvolvimento da resistência. Como exemplo, o fluconazol pode ser vulnerável por duas razões: a primeira delas é que ele é um fungistático, permitindo a sobrevivência de populações celulares expostas a uma forte seleção direta para resistência; a segunda razão é que existem muitos mecanismos para conferir resistência e a frequência nas quais as mutações podem ocorrer em qualquer um desses mecanismos é relativamente alta (ANDERSON, 2005).

A resistência mediada por alteração nas proteínas *Erg11/Cyp51* foi descrita como envolvendo tanto mutação como super expressão de genes. Um grande número de polimorfismos com uma única substituição tem sido descrito em alelos ERG11 de isolados de *C. albicans* resistentes a azólicos. O número de polimorfismo no gene ERG11 é alto e sugere que a proteína *Erg11* seja altamente permissiva a mudanças estruturais, resultantes de substituições de aminoácidos (SANGLARD et al., 2009, MORSCHHÄUSER, 2010).

Um papel importante foi demonstrado para a proteína *Hsp90* na evolução da resistência aos antimicrobianos em diferentes fungos, especialmente fluconazol. A *Hsp90* é uma chaperona essencial em diversos processos biológicos como remodelamento, maturação, transporte e degradação de uma variedade de proteínas, muitas delas exercendo um papel crucial na regulação de vias de sinalização celular (COWEN & LINDQUIST, 2005). O aumento na expressão dessa proteína está relacionado com transcrição de diversos genes em resposta a condições de estresse ambiental. A *Hsp90* potencializa a aquisição de resistência ao fluconazol em *S. cerevisiae* e *C. albicans* quando estas espécies estão expressando constitutivamente altas quantidades dessa proteína, melhor observada quando a resistência é adquirida por seleção rápida do que quando ocorre uma seleção gradual para

resistência fluconazol. A seleção rápida promove uma condição de estresse celular maior, necessitando de uma maior expressão de *Hsp90* que acaba por induzir a seleção de linhagens que possuem mutações no gene *ERG11* que previnem o acúmulo de esteróis 14-metilados, tóxicos para a célula fúngica, resultando em fenótipo de resistência a fluconazol (COWEN & LINDQUIST, 2005; COWEN, 2009).

Observou-se ainda que a proteína *Hsp90* modula resistência a equinocandinas em *A. fumigatus* e *C. albicans*. A inibição farmacológica de *Hsp90* bloqueia a emergência de resistência aos azólicos em *C. albicans* e embora seja necessária para uma tolerância basal a equinocandinas em *A. fumigatus*, sua inibição acentua a atividade antimicrobiana das equinocandinas neste fungo, reduzindo sua tolerância a esse antifúngico e cria ainda, uma combinação fungicida (SINGH et al, 2009).

### 2.5.3 Utilização de vias compensatórias

Em alguns casos, os fungos podem modificar suas vias de biossíntese em resposta à metabólitos tóxicos que resultam da exposição a agentes antifúngicos. Um exemplo desse princípio é o desenvolvimento de resistência aos azólicos por mutação no gene *ERG3*, codificador da enzima delta 5,6 redutase. Quando ativa, esta enzima converte esteróis 14  $\alpha$ -metilados em um derivado tóxico chamado 3,6-diol. Fungos incapazes de produzir este derivado tóxico adquirem resistência aos azólicos. Alelos não funcionais do gene *ERG3* já foram descritos em *C. albicans*. A inativação desse gene está usualmente associada a uma regulação diferencial de genes envolvidos na via de biossíntese do ergosterol; isto é provavelmente a causa da ausência da regulação negativa nos genes desta via bioquímica (SANGLARD et al., 2009, MORSCHHÄUSER, 2010).

Após o aparecimento do fenótipo de resistência o efeito dos diversos mecanismos que podem tê-lo originado em vários ambientes indica se a resistência é mantida ou não na população local. Embora seja esperado que uma perda ou decréscimo do fenótipo de resistência ocorra na ausência do antimicrobiano, muitas vezes isso não acontece. Uma vez que a resistência tenha sido estabelecida, a evolução envolve o aparecimento de mutações

compensatórias que aliviam o custo da resistência aumentado à adaptação desses organismos (ANDERSON, 2005).

O laboratório de Biologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG, tem experiência prévia na aplicação de protocolos para seleção de linhagens resistentes a antimicrobianos por múltiplos passos e por passo único, em diferentes modelos como em protozoários (seleção de linhagens resistentes ao trimetoprim em *Leptomonas seymouri*; seleção de linhagens resistentes ao antimonial pentavalente Glucantime<sup>R</sup> em *Leishmania V. guyanensis*) e em bactérias (seleção de linhagens de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* resistentes ao antisséptico clorexidina) (SADDI, 1995; PETRILLO-PEIXOTO E MOREIRA, 1996; GAZOLA ET AL., 2001; GARBACCIO, 2001; PIRES JÚNIOR, 2004).

A seleção de subpopulações de *P. brasiliensis* progressivamente menos susceptíveis, ou resistentes, aos antifúngicos usualmente empregados na terapêutica da PCM pode permitir estudar e conhecer as principais moléculas envolvidas no processo e ampliar o conhecimento quanto à dinâmica dos mecanismos fisiológicos e genéticos da resistência antimicrobiana neste microrganismo.

### 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo geral

O objetivo principal desse trabalho foi selecionar, a partir de amostras clínicas e ambientais, subpopulações de *Paracoccidioides brasiliensis* menos susceptíveis ou resistentes a antimicrobianos comumente utilizados na terapêutica.

### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos: anfotericina B, itraconazol, cetoconazol, fluconazol, sulfametoxazol, a combinação sulfametoxazol/trimetoprim (Bactrim®) e terbinafina, frente a 21 amostras de *P. brasiliensis* utilizando a técnica de microdiluição;
- Verificar a atividade fungicida ou fungistática dos diferentes antimicrobianos frente a *P. brasiliensis*;
- Verificar se as CIMs obtidas por microdiluição para os antifúngicos testados poderiam ser referenciais para a concentração incorporada em meios sólidos durante a seleção de subpopulações em concentrações crescentes de drogas;
- Selecionar subpopulações de *P. brasiliensis* em concentrações crescentes dos antimicrobianos itraconazol, fluconazol, sulfametoxazol e a combinação sulfametoxazol-trimetoprim (Bactrim®), por meio das técnicas de Múltiplos Passos (Mp) e Passo Único (Pu);
- Avaliar a estabilidade do fenótipo de resistência das subpopulações de *P. brasiliensis* selecionados;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos das subpopulações selecionadas;



- Analisar o perfil de expressão de proteínas totais das amostras parentais e das subpopulações resistentes de *P. brasiliensis* por eletroforese bidimensional (2-DE).

## 4. Material e Métodos

## 4.1 Microrganismos

Analisaram-se 21 amostras, clínicas e ambientais, de *Paracoccidioides brasiliensis* provenientes de diferentes regiões geográficas. As características das amostras como: formas clínicas associadas, origem geográfica, caracterização quanto à espécie filogenética, bem como a sua denominação estão listadas na tabela 1. Essas amostras encontram-se na coleção de culturas do Laboratório de Biologia de Microrganismos, cedidas por diferentes pesquisadores. As amostras Tatu, Pb09, Pinguim e 63265 foram cedidas pelo Dr. Zoilo Pires de Camargo (Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP). As amostras Ed01 e 1578 foram cedidas pela Dr<sup>a</sup>. Maristela Pereira (Universidade Federal de Goiás – UFG).

## 4.2 Manutenção e cultivo das amostras

As amostras de *P. brasiliensis* foram mantidas na forma de micélio (M) com repiques bimestrais. A fase de levedura (L) foi induzida, quando necessário, subcultivando-se em temperatura de 37°C por até 20 dias, para completa conversão, e mantidas com repiques semanais. Tanto a forma M quanto a forma L foram cultivadas em tubos inclinados em meio “Yeast Peptone Dextrose” (extrato de levedura 1%, peptona bacteriológica 2% e dextrose 2% - YPD).

O pH foi acertado para 7,0 e quando se fez necessário a utilização de meio sólido, o mesmo procedimento foi realizado, com adição de ágar 1,5% final. O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Tabela 1: Amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* usadas nesse trabalho

| Isolados              | Fonte                        | Origem Geográfica  | Espécie filogenética <sup>c</sup> |
|-----------------------|------------------------------|--------------------|-----------------------------------|
| Ed01 <sup>g</sup>     | Isolado clínico <sup>j</sup> | Brasil - Goiás     | "Pb01- like"                      |
| 1578 <sup>g</sup>     | Isolado clínico <sup>j</sup> | Brasil - Goiás     | "Pb01- like"                      |
| Pb01 <sup>aef</sup>   | Isolado clínico <sup>j</sup> | Brasil - Goiás     | "Pb01- like"                      |
| Pb4 <sup>defhi</sup>  | PCM crônica                  | Brasil - São Paulo | PS2                               |
| Pb2 <sup>defhi</sup>  | PCM crônica                  | Venezuela          | PS2                               |
| Pb03 <sup>adphi</sup> | PCM crônica                  | Brasil - São Paulo | PS2                               |
| Pb6 <sup>dphi</sup>   | PCM crônica                  | Brasil - Paraná    | S1                                |
| Pb5 <sup>hi</sup>     | PCM crônica                  | Brasil - Paraná    | S1                                |
| B339 <sup>defhi</sup> | PCM crônica                  | Brasil - São Paulo | S1                                |
| Utero <sup>g</sup>    | PCM crônica                  | Argentina          | S1                                |
| Pb11 <sup>dphi</sup>  | PCM aguda                    | Brasil - Paraná    | S1                                |
| Pb13 <sup>dphi</sup>  | PCM aguda                    | Brasil - Goiás     | S1                                |
| Pb10 <sup>dphi</sup>  | PCM aguda                    | Peru               | S1                                |
| Pb14 <sup>dphi</sup>  | PCM aguda                    | Brasil - São Paulo | S1                                |
| 63265                 | PCM aguda                    | Argentina          | S1                                |
| Pb09                  | Lesões Mucocutâneas          | Venezuela          | S1                                |
| Pinguim <sup>df</sup> | Fezes de Pinguim             | Uruguai            | S1                                |
| Tatu                  | Isolado de tatu              | Brasil - Pará      | S1                                |
| Pb9 <sup>dphi</sup>   | PCM crônica                  | Brasil - São Paulo | S1                                |
| Pb8 <sup>dphi</sup>   | PCM crônica                  | Brasil - São Paulo | S1                                |
| Pb18 <sup>adefh</sup> | PCM crônica                  | Brasil - São Paulo | S1                                |

<sup>a</sup> Isolados de *P. brasiliensis* utilizados no projeto de sequenciamento do genoma – “Broad Institute MIT and Harvard”;

<sup>b</sup> PCM – Paracoccidioidomicose;

<sup>c</sup> Espécies filogenéticas agrupadas de acordo com Matute et al., 2006 <sup>d</sup>, Carrero et al., 2008 <sup>e</sup>, Teixeira et al., 2009 <sup>f</sup> e Marini et al., 2010 <sup>g</sup>;

<sup>h</sup> Isolados também usados por Morais et al., 2000;

<sup>i</sup> Isolados revisados por Puccia et al., 2008;

<sup>j</sup> Isolado clínico cuja forma clínica não é conhecida ou não foi informada.

### **4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de antimicrobianos frente a amostras de *P. brasiliensis***

Cada amostra foi testada frente aos antimicrobianos: anfotericina B, itraconazol, cetoconazol, fluconazol, sulfametoxazol, a combinação sulfametoxazol/trimetoprim (Bactrim®) e terbinafina utilizando o protocolo de microdiluição do “Committee Laboratory Standards Institute” (CLSI M27-A2) com modificações e Hahn e colaboradores (HAHN et al., 2002) com modificações. Quatro abordagens experimentais foram testadas:

- 1- Três formulações de meio de cultura: RPMI 1640 (meio padrão para ensaios de determinação de CIM), McVeigh & Morton (MVM) e Mueller-Hinton Modificado (MHM);
- 2- Duas temperaturas de incubação: 37°C para análise da CIM na forma L e temperatura ambiente (TA, 25-28°C) para análise da CIM na forma M do microrganismo;
- 3- Três períodos de incubação: 7, 10 e 15 dias;
- 4- Determinação da CIM em ágar RPMI 1640 para os antimicrobianos anfotericina B, itraconazol, fluconazol e sulfametoxazol; mais utilizados no tratamento da PCM.

Todos os experimentos nesta etapa foram realizados em duplicata.

#### **4.3.1 Preparo de meios de cultura para os ensaios de CIM**

Utilizaram-se três meios de cultura durante os experimentos de determinação de CIM por microdiluição. O caldo RPMI-1640 (Difco) foi preparado como descrito no protocolo padrão CLSI M27-A2, o caldo Mueller Hinton Modificado – MHM foi preparado como descrito em Restrepo e Arango (RESTREPO & ARANGO, 1980) e o caldo McVeigh-Morton – MVM, preparado como descrito em Restrepo e Jiménez (RESTREPO & JIMÉNEZ, 1980). Todos os antimicrobianos foram testados nestes três meios para todos os isolados.

Os componentes dos meios de cultura bem como os procedimentos de preparo e esterilização encontram-se listados no anexo A.

#### 4.3.2 Antimicrobianos utilizados

A anfotericina B (Sigma Chemical Company), em sua forma pura, foi mantida a 4°C em frasco protegido da luz. Os azólicos foram fornecidos pela Farmácia de Manipulação da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, sendo o itraconazol, utilizado na forma de “pellets” e o cetoconazol e fluconazol, utilizados na sua forma pura. A combinação sulfametoxazol-trometopim foi utilizada em sua forma comercial Bactrim (Roche). O sulfametoxazol (Sigma) e a terbinafina (Novartis) foram empregados em sua forma pura. Para todos os experimentos foram utilizados lotes únicos dos respectivos antimicrobianos.

O fluconazol foi dissolvido em água destilada. Os demais antimicrobianos foram diluídos em dimetilsulfóxido 100% (DMSO (Vetec)) de acordo com CLSI M27-A2 momentos antes do uso.

Para o sulfametoxazol e bactrim, preparou-se uma solução estoque na concentração de 5 mg/mL. Para os demais antimicrobianos, preparou-se soluções estoque na concentração de 1 mg/mL.

#### 4.3.3 Diluição dos antimicrobianos

Em 10 tubos de ensaio de 12x75 mm adicionou-se, ao primeiro tubo, caldo (RPMI-1640), MHM ou MVM acrescido de uma concentração do antimicrobiano 2 vezes maior do que o maior valor da faixa intervalar testada. Aos demais tubos adicionaram-se metade do volume do meio líquido RPMI-1640, do MHM ou do MVM necessário para a realização do experimento. Realizou-se a diluição seriada de 1:2, retirando-se metade do volume do primeiro tubo e adicionando-se ao tubo seguinte, e assim sucessivamente, até o décimo tubo, removendo-se a metade do volume do último tubo para que permanecesse constante.

Testaram-se faixas intervalares diferentes para os antimicrobianos (RESTREPO & ARANGO, 1980; CLSI M27-A2 2002, com modificações): para anfotericina B e terbinafina utilizou-se uma faixa intervalar de 0,0078 a 4,0 µg/mL; itraconazol a faixa de 0,0039 a 2,0 µg/mL; cetoconazol testou-se a faixa

de 0,0019 a 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ; para fluconazol, testou-se a faixa de 0,0078 a 4,0  $\mu\text{g/mL}$  ou 0,0078 a 16,0  $\mu\text{g/mL}$  para amostras que apresentaram, inicialmente, valores de CIM igual a 4,0  $\mu\text{g/mL}$ ; sulfametoxazol e bactrim a faixa de 1,17 a 600  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.3.4 Padronização do inóculo

As amostras de *P. brasiliensis* utilizadas no ensaio de CIM foram convertidas da forma M para a L e, sucessivamente, cultivadas em ágar YPD a 37°C, durante 5-7 dias para otimizar a viabilidade celular (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1994).

Preparou-se uma suspensão de células leveduriformes de *P. brasiliensis* em 3 mL de solução salina estéril (0,85%), aguardando-se de 3-5 minutos para que ocorresse decantação de grumos celulares maiores. Seguiu-se a transferência de 1 mL de sobrenadante para tubo de vidro empregando-o para medida espectrofotométrica da transmitância. A densidade foi ajustada para 70% no comprimento de onda de 530nm (HAHN et al., 2002). Para essas condições a concentração de células esperada é de aproximadamente  $1-5 \times 10^6$  céls/mL. A suspensão padronizada foi diluída para 1:10 e posteriormente para 1:2 em RPMI, MHM ou MVM para obtenção de uma concentração final de 0,5 a  $2,5 \times 10^5$  céls/mL.

Para a confirmação da leitura obtida em espectrofotômetro, realizaram-se contagem em câmara de Neubauer com 13 amostras representativas de *P. brasiliensis*.

Realizaram-se também experimentos piloto com concentrações intermediárias de  $0,5-2,5 \times 10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  céls/mL com diluições de 1:1000, 1:100 e 1:10 respectivamente.

#### 4.3.5. Protocolo experimental adotado para determinações de CIM

Para o ensaio de determinação da CIM utilizaram-se placas de acrílico com 96 orifícios, estéreis, de fundo chato e com tampa (Kartell). A suspensão de células obtidas conforme descrito anteriormente foi diluída a 1:10 em caldo

RPMI, caldo MHM ou em caldo MVM, de modo a obter-se  $1-5 \times 10^5$  céls/mL. Em cada orifício da placa colocaram-se 100  $\mu$ L da solução do antimicrobiano em teste acrescido de 100  $\mu$ L do inóculo para cada uma das 21 amostras de *P. brasiliensis*, totalizando 200  $\mu$ L.

Como controle positivo empregou-se o inóculo padrão em caldo RPMI, MHM ou MVM adicionado a um dos orifícios da placa, na ausência do antimicrobiano e como controle negativo empregou-se apenas o caldo RPMI, MHM ou MVM na ausência de inóculo fúngico. Como controle geral do experimento, empregaram-se 2 amostras: *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida krusei* (ATCC 6258), conforme padrões estabelecidos pelo protocolo CLSI M27-A2.

As placas-teste de microdiluição para determinação de CIM foram incubadas a 37°C ou a temperatura ambiente (25-28°C) por 15 dias, em câmara úmida e realizaram-se leituras após 7, 10 e 15 dias de incubação. Realizaram-se também experimentos piloto com leituras em intervalos de 7, 10, 15, 20 e 30 dias.

#### 4.3.6 Leitura e interpretação dos resultados de determinação de CIM

O ponto final da leitura dos resultados de determinação de CIM foi avaliado por meio de observação do crescimento com base na visualização da presença ou ausência de turbidez nos meios de cultura para anfotericina B (100% de inibição). Para os demais antimicrobianos, avaliaram-se quanto à turbidez correspondente à inibição do crescimento em 80% quando comparado com o crescimento observável no controle positivo.

Para facilitar a comparação dos resultados da atividade dos antimicrobianos testados, obtiveram-se faixas de CIM para cada antimicrobiano bem como leituras de CIM que inibiu 50% das amostras (CIM<sub>50</sub>) e da CIM que inibiu 90% (CIM<sub>90</sub>) das amostras testadas.



#### 4.3.7 Determinação da CIM por MTT

Realizaram-se ensaios colorimétricos utilizando sal tetrazólico 3-(4,5-dimetiltriazol-2-yl)-2,5-brometo difeniltetrazólico (MTT; Sigma) que avalia atividade mitocondrial (DERENGOWSKI et al., 2009), com modificações. Testaram-se 8 das 21 amostras de *P. brasiliensis* com os antimicrobianos anfotericina B (Ed01, 1578, Pb01, Pb03, Pb6, Pb14, Tatu e Pb18) e 6 das 21 amostras para itraconazol (Ed01, 1578, Pb01, Pb11, Tatu e Pb18) em cultivos em meio RPMI. O experimento foi realizado em duplicata para cada um dos tempos de leitura, objetivando apenas uma comparação com as leituras visuais realizadas previamente para a determinação de CIM.

Decorrido cada tempo de leitura, 20 µL da cultura das placas de microtitulação foram descartados, adicionando-se a cada orifício da placa uma solução contendo 5 mg/mL de MTT diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,15M para uma concentração final de 0,5 mg/mL por orifício. Após a incubação das placas a 36°C durante 4 horas na ausência de luz, o meio contendo MTT foi parcialmente removido (100 µL) adicionando-se 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar os cristais de formazan (subproduto do MTT). Procedeu-se à leitura espectrofotométrica do complexo MTT-formazan a 490 nm. Comparou-se a absorvância (abs) das soluções nos poços testes com a absorvância do poço do controle positivo do crescimento microbiano (meio de cultura contendo cultivo de *P. brasiliensis* e ausência de antimicrobianos), sendo a porcentagem de inibição calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 100 \times \frac{(\text{abs do poço controle} - \text{abs do poço teste})}{\text{abs do poço controle}}$$

O valor da CIM foi estabelecido como a concentração que inibiu 90 a 100% do crescimento celular para anfotericina B e a concentração que resultou em 70 a 80% de inibição do crescimento para itraconazol quando comparado com a absorvância do orifício controle. Para efeito de comparação, procedeu-se a leitura visual das placas antes e após o período de incubação com MTT.

#### 4.3.8 Ensaio de CIM utilizando método de diluição em ágar

Para a realização da determinação de CIM foi utilizado o Agar RPMI acrescentando-se ou não dos antifúngicos testados (sulfametoxazol, itraconazol, anfotericina B e fluconazol), e ágar YPD acrescentado ou não de sulfametoxazol.

A suspensão padronizada como descrito em 4.3.4 foi semeada em alíquotas pontuais de 10 µl ( $1-5 \times 10^4$  células) de cada uma das 21 amostras de *P. brasiliensis* na superfície das placas de Petri previamente preparadas (anexo A). Todas as placas foram vedadas com parafilme para manter a umidade do meio de cultura e cultivadas a 37°C, durante 15 dias, em câmara úmida.

A faixa intervalar utilizada na realização desse experimento foi definida empregando-se os antimicrobianos na concentração correspondente aos valores de CIM previamente obtidos por meio da técnica de microdiluição em caldo RPMI e em duas concentrações abaixo e acima da CIM obtida para cada amostra, com incubação a 37°C e leituras com 15 dias.

#### 4.3.9 Observação da morfologia de *P. brasiliensis*

Para a realização do acompanhamento da morfologia de *P. brasiliensis* em meios de cultura, utilizaram-se 14 amostras (Ed01, Pb01, Pb2, Pb03, Pb5, B339, Útero, Pb13, Pb10, Pb09, Pinguim, Tatu, Pb9 e Pb18). Essas amostras foram cultivadas em caldo RPMI suplementado com 2% de glicose, MHM e YPD (controle positivo) em placas de microtitulação à 37°C durante 15 dias. Em intervalos de 2, 5, 7, 10 e 15 dias, alíquotas de 10 µL do cultivo foram preparadas com 5 µL de solução de lactofenol e observadas em microscopia óptica em aumento de 40X.

### **4.4 Análises da atividade fungicida ou fungistática dos antimicrobianos frente a *P. brasiliensis***

A atividade fungicida ou fungistática *in vitro* foi determinada para os antifúngicos anfotericina B, itraconazol, fluconazol, sulfametoxazol, bactrim e terbinafina, somente em meio RPMI e MHM, e temperatura de 37°C para cada

amostra de *P. brasiliensis* como recomendado por Espinel-Ingroff e colaboradores (ESPINEL-INGROFF, 1998; ESPINEL-INGROFF et al., 2002) com modificações.

Após 15 dias de incubação, 10 µL de suspensões provenientes do orifício da placa de microtitulação correspondente a CIM, de dois orifícios acima da CIM, e do controle positivo de crescimento (meio de cultura sem antimicrobiano) foram subcultivados em placas com ágar YPD. As placas foram incubadas a 37°C em câmara úmida. O tempo de incubação foi acompanhado com base no crescimento do controle positivo.

A atividade fungicida foi considerada como ausência de crescimento das amostras e a atividade fungistática foi considerada como um crescimento residual e contínuo das amostras em ágar YPD.

#### **4.5 Análises estatísticas**

A análise estatística para a validação dos experimentos de CIM foi realizada utilizando os métodos não paramétricos de Friedman e Wilcoxon. O intervalo de confiança escolhido foi de 95% em todas as análises e valores de *P* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos (SAMPAIO, 2002).

#### **4.6 Seleções de subpopulações de *P. brasiliensis* em concentrações crescentes de antifúngicos**

4.6.1 Escolha do meio de cultura para o ensaio de seleção de subpopulações de *P. brasiliensis*

Testaram-se inicialmente dois meios de cultura (MHM e MVM) para um melhor controle da interferência de seus componentes no processo de seleção. Todas as amostras de *P. brasiliensis* foram semeadas em tubos de vidro de 18x180mm contendo ágar MHM ou MVM, sucessivamente até um total de 3 repiques, e incubados a 37°C durante 15 dias. A cada intervalo de repique, as amostras foram analisadas visualmente quanto à capacidade de sustentar o crescimento nestes meios em comparação com o seu crescimento no controle

positivo (ágar YPD). Como controle negativo de crescimento, utilizou-se o meio MH por possuir em sua composição a lactose, não metabolizada por *P. brasiliensis* (FELIPE et al., 2005 (a)).

#### 4.6.2 Ensaio de seleção de subpopulações de *P. brasiliensis* menos susceptíveis ou resistentes a antifúngicos

Após a determinação da CIM, escolheram-se as amostras de *P. brasiliensis* para realizar-se seleção de subpopulações menos susceptíveis ou resistentes a itraconazol, fluconazol, sulfametoxazol, e Bactrim® pelos protocolos de seleção por Passo Único (PU) e Múltiplos Passos e (MP) (SADDI, 1995; PETRILLO-PEIXOTO E MOREIRA, 1996; GAZOLA et al., 2001; GARBACCIO, 2001; PIRES JÚNIOR, 2004), com modificações. Utilizaram-se valores de CIM obtidos em cultivos no meio RPMI a 37°C e leitura de 15 dias para as amostras e antimicrobianos testados.

Empregando-se o protocolo de PU, semeou-se 1 mL do inóculo padronizado de cada amostra de *P. brasiliensis* em ágar YPD na presença ou ausência dos antifúngicos selecionados até um total de 20 placas, vedadas com parafilme e incubadas a 37°C, durante 20-30 dias, em câmara úmida. O acompanhamento do ensaio foi realizado através da observação do crescimento das amostras nas placas controle (ágar YPD, na ausência de antifúngico).

Testaram-se também inóculos em ágar YPD de suspensões de cultivos oriundos diretamente das placas de microtitulação (DPM) onde se realizaram ensaios de determinação de CIM para sulfametoxazol. Retiraram-se volumes de 100 µL da cultura provenientes de orifício da placa onde se visualizou turbidez correspondente à inibição em 80% do crescimento (CIM), semeando-se em placas contendo ágar YPD e sulfametoxazol na mesma concentração da CIM para as amostras 1578, Pb01, Pb2, Pb6, Pb5, B339, Útero, Pb11, Pb13, Pb10, Pb14, 63265, Pb09, Pinguim, Pb9, Pb8 e também Ed01. As placas foram incubadas tanto a 37°C como a temperatura ambiente (25-28°C) durante 20-30 dias ou até a visualização do crescimento na placa controle (YPD sem sulfametoxazol).

Após a seleção inicial pela técnica de PU, utilizou-se a técnica de MP para dar continuidade ao processo de seleção por meio de repiques sucessivos. Homogeneizaram-se cada um dos clones das amostras selecionadas por PU em 20  $\mu$ L de solução salina 0,85% estéril e semeou-se por meio de inóculos pontuais de 10  $\mu$ L em ágar YPD contendo o antifúngico na mesma concentração de seleção. Vedaram-se as placas com parafilme seguindo-se incubação a 37°C, durante 20-30 dias, em câmara úmida (experimentos realizados em duplicata).

A cada 3 repiques sucessivos na mesma concentração de droga, os clones foram desafiados em concentrações crescentes dos antimicrobianos até que a concentração onde não se observou crescimento. Realizou-se também ensaio de determinação de CIM em ágar YPD conforme item 4.3.8 para validar o processo de seleção em meio YPD para sulfametoxazol.

As colônias que cresceram foram submetidas à avaliação da estabilidade do fenótipo e posteriormente, mantidas ágar YPD contendo o antimicrobiano na concentração final na qual foram isoladas.

#### **4.7 Avaliação da estabilidade da resistência aos antimicrobianos**

As subpopulações de *P. brasiliensis* progressivamente menos sensíveis, ou resistentes, selecionadas pela técnica de Mp e Pu foram avaliadas quanto à capacidade de sustentar o fenótipo de resistência. Para isso, as subpopulações isoladas frente ao antimicrobiano foram mantidas por repiques sucessivos em meio sólido YPD sem o antimicrobiano em questão e incubadas a 37°C por 15 dias em câmara úmida. A cada 10 repiques em meio sólido, sob as mesmas condições, as amostras foram novamente desafiadas na presença do antifúngico na concentração de seleção e mesmo em concentrações crescentes de modo a verificar a estabilidade do fenótipo de resistência (PIRES JÚNIOR, 2004).

Após análise da estabilidade do fenótipo, realizou-se um novo ensaio de determinação de CIM em caldo RPMI dos clones selecionados em sulfametoxazol, utilizando uma faixa intervalar de 100-1000  $\mu$ g/mL para esse antifúngico e as mesmas faixas intervalares utilizadas nos demais

antimicrobianos para as amostras parentais, objetivando-se a comparação dos valores de CIM dos antifúngicos entre amostras parentais e amostras selecionadas.

#### **4.8 Extração de DNA genômico de *P. brasiliensis***

Procedeu-se à extração de DNA de acordo com Girardin & Latgé (GIRARDIN & LATGÉ, 1994) e San-Blas e colaboradores (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1994), com modificações.

Amostras de *P. brasiliensis* foram cultivadas em ágar YPD a 37°C durante 5-15 dias. Em seguida, raspou-se a cultura celular e estas foram lavadas em 20 mL de água destilada estéril e centrifugadas a 8.228 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e secou-se a massa celular entre 2 folhas de papel filtro estéril. As células secas foram colocadas em um grau estéril e maceradas com o auxílio de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Transferiu-se uma massa de aproximadamente 300 mg do macerado celular para um tubo de 2 mL contendo 800 µL de tampão de lise e 8µL de proteinase K (10 mg/mL). A solução foi homogeneizada com auxílio de vortex e incubada a 65°C durante 1 hora. Após decorrido esse tempo, adicionou-se 600 µL de fenol tamponado e 200 µL de clorofórmio. A solução foi novamente homogeneizada até a obtenção de uma suspensão homogênea e centrifugou-se a 21.728 g durante 1 hora. Coletou-se a fase aquosa transferindo-a para outro tubo de 2 mL com o auxílio de ponteira com barreira. Adicionou-se igual volume de clorofórmio, misturou-se delicadamente por inversão e centrifugou-se a 21.728 g por 10 min. Esse procedimento foi realizado 2 vezes. Após a segunda lavagem com clorofórmio, a fase aquosa foi novamente coletada e transferida para outro tubo de 2 mL, adicionando-se 840 µL de isopropanol e 40 µL de NaCl 4M. Em seguida, procedeu-se à inversão do tubo delicadamente até a visualização do DNA e centrifugou-se a 21.728 g durante 2 min. Descartou-se o sobrenadante, lavou-se o sedimento em 1 mL de etanol 70% e a solução foi centrifugada a 21.728 g rpm por 2 min. O sobrenadante foi descartado e deixou-se o tubo contendo DNA secar a temperatura ambiente

por 10 min. Ressuspendeu-se o DNA em 88  $\mu\text{L}$  de TE acrescido de 12  $\mu\text{L}$  de Rnase (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A solução foi incubada a 37°C durante 1-2 horas.

Para a avaliação qualitativa, as amostras de DNA foram resolvidas em eletroforese em gel de agarose a 1% contendo tampão TAE 1x. A corrida foi realizada a 70 V durante 1 hora. Em seguida, corou-se o gel com solução de brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 15 min. e procedeu-se à visualização sob luz UV. Para a quantificação da amostra de DNA procedeu-se á leitura da densidade óptica (nanoDrop®).

#### Soluções utilizadas:

- Tampão de lise:  
1,0 mL de Tris (1M);  
2,5 mL de EDTA (0,5M);  
3,0 mL de NaCl (4M);  
2,5 mL de SDS (20%);  
Água destilada para volume final de 50 mL.
- Solução de TE  
500  $\mu\text{L}$  de Tris (1M);  
100  $\mu\text{L}$  de EDTA (0,5M);  
Água destilada para volume final de 50 mL.
- Solução TAE 1X  
Tris-HCl 40 mM;  
EDTA 1 mM;  
Ácido acético glacial 0,114%  
pH 7,5.

#### 4.9 Confirmação da identidade de clones de *P. brasiliensis*

A identidade dos clones de *P. brasiliensis* que apresentaram bloqueio no dimorfismo térmico foi confirmada pela amplificação do gene *GP43* por meio de

Nested PCR segundo Bialek e colaboradores (BIALEK et al., 2000). As informações referentes aos iniciadores utilizados encontram-se listados na tabela 2.

Realizou-se a primeira reação de PCR (externa) por meio da adição de 5,0 µl de tampão 10X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl [pH 8.3]) seguindo-se 0,2 µl da mistura de dNTP's (0,1mM), 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), 1,5 µl do iniciador GPI-F (Forward), 1,5 µl do iniciador GPII-R (Reverse), 0,3 µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 50 ng de DNA genômico dos clones de *P. brasiliensis* e água destilada para um volume final de 50 µl.

A segunda reação (interna ou "Nested") se constituiu de 5,0 µl de tampão 10X (50mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.3]), 0,1 µl da mistura de dNTP's (0,05mM), 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (2,5mM), 1,5 µl do iniciador GPIII-F (Forward), 1,5 µl do iniciador GPIV-R (Reverse), 0,3 µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 1 µl do produto de amplificação obtido na primeira reação (externa) e água destilada para um volume final de 50 µl .

Os programas utilizados para as duas reações (externa e interna) foram diferentes. Na PCR externa, o primeiro passo de amplificação consistiu de pré-desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 50°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto e extensão final de 5 minutos a 72°C. Para a PCR interna (2ª reação), o primeiro passo de amplificação consistiu de pré-desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto e extensão final de 5 minutos a 72°C.

Os produtos da reação de PCR foram resolvidos em gel de agarose 1% (p/v) tamponado com TAE 1X (Tris-acetato 0,04M; 0,001M de EDTA). Realizou-se a corrida a 70 V em cuba de eletroforese mergulhada em TAE na mesma concentração feita para o gel. Corou-se com solução de brometo de etídio para concentração final de 0,5µg/mL e visualizou-se em luz UV.



Tabela 4: Iniciadores usados para amplificação por Nested PCR

| Iniciadores    | Seqüências                     | Loci gênico | Fragmentos Amplificados |
|----------------|--------------------------------|-------------|-------------------------|
| <b>GPI-F</b>   | 5'AACTAGAATATCTCACTCCCAGTCC 3' | gp43        | (355 pb)                |
| <b>GPII-R</b>  | 5'TGTAGACGTTCTTGTATGTCTTGGG3'  |             |                         |
| <b>GPIII-F</b> | 5'GATCGCCATCCATACTCTCGCAATC3'  | gp43        | (196 pb)                |
| <b>GPIV-R</b>  | 5'GGGCAGAGAAGCATCCGAATTGCG3'   |             |                         |

#### 4.10 Preparo de extrato protéico de amostras parentais e de subpopulações selecionadas de *P. brasiliensis*

Todas as seções descritas a seguir envolvendo preparo e resolução de amostras foram realizadas conforme o manual do fabricante GE Healthcare com modificações (GÖRG, 2004).

O extrato de células do *P. brasiliensis* tanto da fase L quanto da fase M foi obtido a partir de células crescidas em ágar YPD suplementado ou não com o antifúngico de acordo com os perfis de seleção, durante 15-20 dias a 37°C ou à temperatura ambiente em câmara úmida.

Para obtenção das proteínas totais as células foram lavadas com solução salina 0,85%, ressuspensas em tampão de lise uréia/ tiouréia e acondicionadas em gelo. A lise celular foi procedida mecanicamente por maceração na presença de nitrogênio líquido com o auxílio de gral. Após a lise celular, a suspensão foi coletada em tubos de 2 mL e centrifugada a 12.857 g durante 20 min. para retirada dos debris celulares. A suspensão foi coletada em novos tubos de 2 mL, quantificada com o kit 2D-Gel Quant (GE Healthcare), segundo as recomendações do fabricante, e armazenada a -80°C.

Solução utilizada:

- Tampão de lise:  
 Uréia 8M;  
 Tiouréia 2M;  
 CHAPS 4%;  
 DTT;

Tris 1M;  
Inibidores de protease (cocktail);  
Água mili-Q estéril.

#### **4.11 Resolução eletroforética de extratos protéicos das amostras de *P. brasiliensis* em SDS-PAGE**

Os géis para resolução em SDS-PAGE foram confeccionados a partir de uma solução estoque (p/v) de acrilamida 30% e bis-acrilamida 0,8% diluída para uma concentração final de 12 % em Tris-HCl (375 mM, pH 8,8) e SDS 0,1 % (p/v) para preparação do gel de separação e, diluída a 4 % em Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1 % (p/v) para preparação do gel de aplicação e concentração das amostras. A polimerização dos géis de concentração e separação ocorreu na presença de persulfato de amônio e TEMED (Sigma-Aldrich, Inc.) nas concentrações finais de 0,1 % e 1:2000 (v/v) respectivamente.

As amostras de proteínas foram desnaturadas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo SDS 2 %, glicerol 10 %, azul de bromofenol 0,0005 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 2,5 %), homogeneizadas em “vortex” e na ausência de uréia fervidas por 5 min. a 90 – 100° C. A eletroforese foi realizada a 200 V por cerca de 45 min, em tampão Tris-glicina (Tris base 25 mM pH 8,3, glicina 250 mM, SDS 0,1 %). O gel foi corado com azul de coomassie (Coomassie blue R 250 0,25 %, metanol 50 %, ácido acético 10 %) por 2 horas à temperatura ambiente e lavada várias vezes com solução descorante total (metanol 30 %, ácido acético 10%). A massa molecular das proteínas foi comparada com padrão de peso molecular de proteínas Bench Mark TM Protein Ladder (Invitrogen).

#### **4.12 Resolução dos extratos protéicos das amostras de *P. brasiliensis* em eletroforese bidimensional (2-DE)**

As quantidades definidas de proteínas totais obtidas como descrito anteriormente (item 4.10) foram adicionadas ao tampão IEF (8M Uréia, 4% CHAPS, 2M Tiouréia, traço de azul de bromofenol) acrescentados de 10 mg/mL de DTT , 0,2% de anfólitos (IPG buffer) específicos para a “strip”

utilizada, de acordo com as recomendações do fabricante. A amostra pronta para IEF foi utilizada para hidratação passiva de “strips” pH 3 a 10 NL (não linear – GE); a hidratação passiva foi realizada por 18 horas a temperatura ambiente.

A focalização isoeétrica foi realizada a 500 V por uma hora, 1000 V por uma hora, 8000 V por 2 horas e 8000 V até serem acumulados 4000 V/hora. A “strip” foi retirada da máquina e o excesso de óleo mineral drenado; posteriormente foi equilibrada em tampão de equilíbrio (6M Uréia; glicerol 30%; SDS 2%; 50 mM Tris-HCl pH 8,8; traço de azul de bromofenol) contendo 10 mg/mL de DTT, por 15 minutos, sob agitação em bandeja descartável. Realizou-se nova lavagem substituindo o DTT por 25 mg/mL de iodo acetamida e a amostra incubada por 15 minutos adicionais, sob agitação, à temperatura ambiente.

Para a segunda dimensão, a “strip” foi retirada da bandeja, lavada com tampão de corrida SDS-PAGE e colocada sobre o gel de poliacrilamida 12%, preparado como descrito anteriormente, e selada com agarose 0,5% em tampão de corrida. A eletroforese foi realizada sob 100 – 150 V. Após a corrida, o gel foi fixado e corado com coomassie blue G-250 2% (coomassie coloidal), compatível com análise por espectrometria de massas.

## 5. Resultados

## 5.1 Avaliação das condições experimentais para a execução de ensaios de determinação de CIM por microdiluição

Nos ensaios preliminares em que foram adotadas as condições preconizadas pelo documento de referencia (CLSI M27 A-2), evidenciou-se a impossibilidade de crescimento para algumas amostras (Pb11, Pb6, Tatu, Pb10 e Pinguim) quando cultivadas em placas de microdiluição, na presença ou ausência de antifúngicos (anfotericina B e cetoconazol), após 7 dias de incubação. Após 10 dias de incubação houve crescimento, diferenciado entre as cepas, de todas as 21 amostras testadas, sendo possível observar que os valores de CIM se alteravam no intervalo de incubação entre o sétimo e o décimo dias. Após 15 dias de incubação detectaram-se, para algumas amostras e determinados antimicrobianos, valores de CIM razoavelmente constantes tendo, todas as amostras, apresentado crescimento satisfatório em comparação com o controle (meio de cultura sem antifúngico). Após 20 dias de incubação, os valores de CIM permaneceram estáveis para todas as amostras analisadas até o final do período (30 dias). No entanto, houve considerável evaporação do meio de cultura nas placas de microtitulação após 20 dias de incubação, reduzindo a confiabilidade dos resultados obtidos após esse período, mesmo em câmara úmida.

Inóculos iniciais de  $10^3$  e  $10^4$  céls/mL não permitiram crescimento favorável nos orifícios das placas de microtitulação correspondentes ao controle positivo do experimento (meio de cultura sem antifúngico). Observou-se crescimento satisfatório no controle quando se realizou o inóculo inicial com  $10^5$  céls/mL, possibilitando uma melhor visualização nas leituras de CIM. A comparação entre quantificação espectrofotométrica (70% de transmitância) e o número de céls/mL ( $1-5 \times 10^6$  céls/mL) realizada por meio de contagem em câmara de Neubauer, apresentou conformidade fornecendo valores que variaram entre 1,18 e  $3,15 \times 10^6$  céls /mL (anexo B, tabela 5).

Após o término dos experimentos piloto, utilizou-se para o ensaio da determinação de CIM um inóculo inicial de  $0,5-2,5 \times 10^5$  céls/mL, período de incubação de 15 dias, registrando-se leituras com intervalos de 7, 10 e 15 dias.

## 5.2 Determinação de CIM em caldo RPMI

Os dados referentes à determinação de CIM dos antimicrobianos anfotericina B, itraconazol, cetoconazol, fluconazol, sulfametoxazol, bactrim e terbinafina frente a 21 amostras clínicas e ambientais de *P. brasiliensis*, em diferentes condições experimentais, encontram-se condensados na tabela 6 e detalhados no anexo C (tabelas 7-13).

Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) (ANEXO D, tabelas 14-20) nos valores de CIM durante os intervalos de leitura de 7, 10 e 15 dias, a 37°C, sendo a leitura de 15 dias a mais estável para análise dos resultados.

As leituras a 37°C, neste último intervalo (15 dias), registraram valores baixos de CIM para 6 dos 7 antimicrobianos testados. Nesta temperatura, as concentrações variaram de 0,0039 – 0,062 µg/µL para itraconazol; 0,0019 – 0,031 µg/mL para cetoconazol; 0,25 – 8,0 µg/mL para fluconazol; 150 – 300 µg/mL para sulfametoxazol, 75 – 300 µg/mL para bactrim e 0,125 – 0,5 µg/mL para terbinafina. Já as concentrações para anfotericina B variaram de 0,25 a 2,0 µg/mL.

Os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> encontrados no cultivo a 37°C foram, respectivamente: 0,0078 e 0,062 µg/mL para itraconazol; 0,0019 e 0,015 µg/mL para cetoconazol; 1,0 e 2,0 µg/mL para fluconazol; 150 e 300 µg/mL para bactrim e 0,25 e 0,5 µg/mL para terbinafina. Encontraram-se valores iguais de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> para anfotericina B (1 µg/mL), sulfametoxazol e bactrim (300 µg/mL). Algumas amostras de *P. brasiliensis* apresentaram valores de CIM maiores que a CIM<sub>90</sub> para determinados antimicrobianos: Pb14 e Pb9, CIM de 2,0 µg/mL para anfotericina B; Pb11 e Pb4, CIM de 0,031 µg/mL para cetoconazol e 8,0 µg/mL para fluconazol.

É importante ressaltar que durante o ensaio de determinação de CIM à temperatura de 37°C observou-se que em 17 (81%) das 21 amostras de *P. brasiliensis* testadas ocorreu uma transição de levedura para micélio, independente da presença de antifúngicos (figura 1). As amostras ambientais Tatu e Pinguim, e as amostras clínicas Pb13 e Pb14 permaneceram leveduriformes durante todo período de leitura.

Tabela 6: Determinação de CIM dos antimicrobianos anfotericina B, itraconazol, cetoconazol, fluconazol, sulfametoxazol, bactrim e terbinafina frente a 21 amostras clínicas e ambientais de *P. brasiliensis* em diferentes condições experimentais

| Meio (temp) | Tempo de incubação (dias) | CIM (µg/ml)    |        |       |               |        |        |               |        |        |            |       |     |                |       |       |             |       |       |             |       |       |
|-------------|---------------------------|----------------|--------|-------|---------------|--------|--------|---------------|--------|--------|------------|-------|-----|----------------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------------|-------|-------|
|             |                           | Anfotericina B |        |       | Itraconazol   |        |        | Cetoconazol   |        |        | Fluconazol |       |     | Sulfametoxazol |       |       | Bactrim®    |       |       | Terbinafina |       |       |
|             |                           | Faixa          | 50%    | 90%   | Faixa         | 50%    | 90%    | Faixa         | 50%    | 90%    | Faixa      | 50%   | 90% | Faixa          | 50%   | 90%   | Faixa       | 50%   | 90%   | Faixa       | 50%   | 90%   |
| RPMI (37°C) | 7                         | 0.25_1.0       | 1.0    | 1.0   | 0.0039_0.062  | 0.0078 | 0.031  | 0.0019_0.015  | 0.0019 | 0.015  | 0.125_8.0  | 0.5   | 2.0 | 75.0_300.0     | 150.0 | 300.0 | 18.75_300.0 | 150.0 | 150.0 | 0.031_0.5   | 0.125 | 0.25  |
|             | 10                        | 0.25_2.0       | 1.0    | 1.0   | 0.0039_0.062  | 0.0078 | 0.031  | 0.0019_0.031  | 0.0019 | 0.015  | 0.125_8.0  | 0.5   | 2.0 | 75.0_300.0     | 150.0 | 300.0 | 37.5_300.0  | 150.0 | 150.0 | 0.062_0.5   | 0.125 | 0.25  |
|             | 15                        | 0.25_2.0       | 1.0    | 1.0   | 0.0039_0.062  | 0.0078 | 0.062  | 0.0019_0.031  | 0.0019 | 0.015  | 0.25_8.0   | 1.0   | 2.0 | 150.0_300.0    | 300.0 | 300.0 | 75.0_300.0  | 150.0 | 300.0 | 0.125_0.5   | 0.25  | 0.5   |
| MHM (37°C)  | 7                         | 0.0078_0.25    | 0.125  | 0.125 | 0.0039_0.0039 | 0.0039 | 0.0039 | 0.0019_0.0019 | 0.0019 | 0.0019 | 0.062_1.0  | 0.25  | 0.5 | 9.37_150.0     | 75.0  | 150.0 | 18.75_300.0 | 75.0  | 150.0 | 0.0078_0.25 | 0.015 | 0.125 |
|             | 10                        | 0.015_0.5      | 0.125  | 0.125 | 0.0039_0.0039 | 0.0039 | 0.0039 | 0.0019_0.0019 | 0.0019 | 0.0019 | 0.062_1.0  | 0.25  | 1.0 | 9.37_150.0     | 75.0  | 150.0 | 18.75_300.0 | 75.0  | 150.0 | 0.0078_0.25 | 0.015 | 0.125 |
|             | 15                        | 0.125_1.0      | 0.25   | 0.25  | 0.0039_0.0039 | 0.0039 | 0.0039 | 0.0019_0.0019 | 0.0019 | 0.0019 | 0.062_1.0  | 0.25  | 1.0 | 9.37_150.0     | 75.0  | 150.0 | 18.75_300.0 | 75.0  | 150.0 | 0.0078_0.25 | 0.015 | 0.125 |
| MVM (37°C)  | 7                         | 0.0078_1.0     | 1.0    | 1.0   | 0.062_0.25    | 0.25   | 0.25   | 0.0078_0.031  | 0.015  | 0.031  | 0.5_4.0    | 1.0   | 4.0 | 1.17_18.75     | 18.75 | 18.75 | 1.17_18.75  | 9.37  | 18.75 | 0.031_1.0   | 0.5   | 1.0   |
|             | 10                        | 0.0078_2.0     | 0.5    | 2.0   | 0.0039_0.25   | 0.0078 | 0.25   | 0.0019_0.031  | 0.0078 | 0.031  | 0.0078_2.0 | 0.5   | 2.0 | 1.17_18.75     | 2.34  | 18.75 | 1.17_18.75  | 4.68  | 18.75 | 0.0078_1.0  | 0.5   | 1.0   |
|             | 15                        | 0.0078_2.0     | 0.5    | 2.0   | 0.0039_0.25   | 0.0078 | 0.25   | 0.0019_0.031  | 0.0078 | 0.031  | 0.0078_2.0 | 1.0   | 2.0 | 1.17_18.75     | 4.68  | 18.75 | 1.17_18.75  | 4.68  | 18.75 | 0.0078_1.0  | 0.5   | 1.0   |
| RPMI (TA)   | 7                         | 0.031_0.5      | 0.125  | 0.25  | 0.0039_0.125  | 0.031  | 0.062  | 0.0019_0.25   | 0.031  | 0.25   | 0.5_8.0    | 1.0   | 4.0 | 75.0_300.0     | 150.0 | 300.0 | 75.0_300.0  | 150.0 | 300.0 | 0.0078_4.0  | 0.25  | 1.0   |
|             | 10                        | 0.125_1.0      | 0.25   | 1.0   | 0.0039_0.125  | 0.062  | 0.125  | 0.0019_2.0    | 0.031  | 0.25   | 0.5_8.0    | 2.0   | 4.0 | 75.0_300.0     | 300.0 | 300.0 | 150.0_300.0 | 300.0 | 300.0 | 0.0078_4.0  | 0.5   | 1.0   |
|             | 15                        | 0.25_1.0       | 1.0    | 1.0   | 0.0078_0.125  | 0.062  | 0.125  | 0.0039_2.0    | 0.031  | 0.25   | 0.5_8.0    | 2.0   | 8.0 | 300.0_300.0    | 300.0 | 300.0 | 300.0_300.0 | 300.0 | 300.0 | 0.0078_4.0  | 1.0   | 2.0   |
| MHM (TA)    | 7                         | 0.0078_0.062   | 0.0078 | 0.062 | 0.0039_0.125  | 0.0039 | 0.0078 | 0.0019_0.0078 | 0.0019 | 0.0078 | 0.031_2.0  | 0.25  | 2.0 | 9.37_150.0     | 150.0 | 150.0 | 18.75_300.0 | 150.0 | 300.0 | 0.0078_1.0  | 0.062 | 0.25  |
|             | 10                        | 0.0078_0.125   | 0.031  | 0.062 | 0.0039_0.125  | 0.0039 | 0.015  | 0.0019_0.0078 | 0.0019 | 0.0019 | 0.031_2.0  | 0.25  | 2.0 | 18.75_300.0    | 150.0 | 300.0 | 18.75_300.0 | 150.0 | 300.0 | 0.0078_1.0  | 0.125 | 0.25  |
|             | 15                        | 0.015_0.25     | 0.031  | 0.25  | 0.0039_0.125  | 0.0039 | 0.031  | 0.0019_0.0078 | 0.0019 | 0.0039 | 0.062_2.0  | 0.25  | 2.0 | 37.5_300.0     | 150.0 | 300.0 | 75.0_300.0  | 150.0 | 300.0 | 0.062_1.0   | 0.125 | 0.25  |
| MVM (TA)    | 7                         | -              | -      | -     | 0.125_0.125   | 0.125  | 0.125  | 0.062_0.062   | 0.062  | 0.062  | 1.0_4.0    | 4.0   | 4.0 | 2.34           | 2.34  | 2.34  | 9.37_18.75  | 18.75 | 18.75 | 0.062_2.0   | 2.0   | 2.0   |
|             | 10                        | 0.031_2.0      | 0.5    | 2.0   | 0.0039_0.125  | 0.015  | 0.125  | 0.0019_0.062  | 0.031  | 0.062  | 0.015_4.0  | 0.062 | 4.0 | 1.17_37.5      | 4.68  | 37.5  | 1.17_75.0   | 4.68  | 75.0  | 0.0078_2.0  | 0.062 | 1.0   |
|             | 15                        | 0.031_2.0      | 1.0    | 2.0   | 0.0039_0.125  | 0.031  | 0.125  | 0.0078_0.062  | 0.062  | 0.062  | 0.031_4.0  | 0.25  | 4.0 | 9.37_37.5      | 9.37  | 37.5  | 1.17_75.0   | 9.37  | 75.0  | 0.031_2.0   | 0.062 | 1.0   |

(-): ausência de crescimento  
temp: temperatura de incubação  
TA: temperatura ambiente

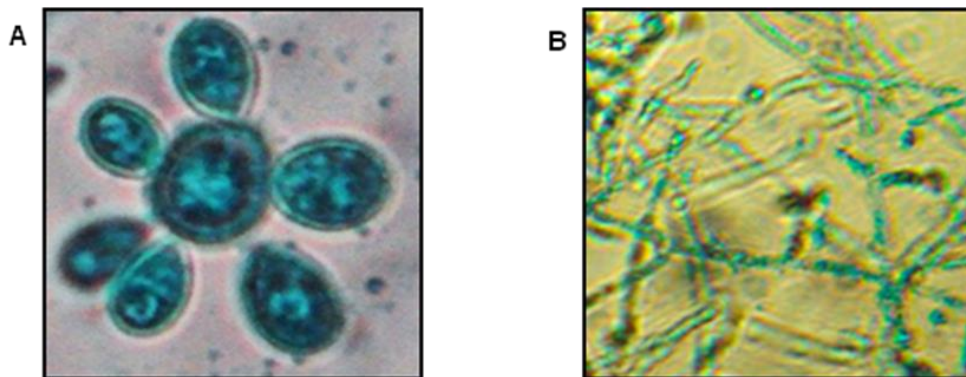


Figura 1: Morfologia da amostra Pb18 de *P. brasiliensis* no início e ao fim do ensaio de determinação de CIM em caldo RPMI, a 37°C. Em **A**: morfologia leveduriforme no inóculo inicial. **B**: morfologia filamentosa após 15 dias de incubação, ao final do ensaio de determinação de CIM. Lâminas preparadas com 10  $\mu$ L do inóculo inicial (A), 10  $\mu$ L do volume do orifício controle do ensaio de determinação de CIM (B), adicionadas de 1  $\mu$ L de lactofenol e observadas por microscopia óptica em aumento de 40x.



A presença da morfologia filamentosa e/ou mista (filamentosa e leveduriforme) ao final do ensaio de determinação de CIM tornou questionáveis os resultados obtidos no meio RPMI, a 37°C. Realizou-se também a avaliação do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos por meio de cultivos em caldo RPMI, à temperatura ambiente (TA), onde se esperaria morfologia filamentosa, realizando-se leituras com os mesmos intervalos para comparação dos resultados. Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) nos valores de CIM durante os intervalos de leitura de 7, 10 e 15 dias nos testes à temperatura ambiente sendo a leitura de 15 dias mais estável para análise dos resultados (ANEXO D, tabelas 14-20).

Todas as 21 amostras apresentaram morfologia filamentosa ao final dos experimentos em TA. Houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de CIM obtidos nas duas temperaturas ( $P < 0,05$ ) (ANEXO D, tabelas 14-20). Detectaram-se, em TA, menores valores de CIM para a anfotericina B (0,25-1,0  $\mu\text{g/mL}$ ) e maiores valores de CIM para os antimicrobianos: itraconazol (0,0078-0,125  $\mu\text{g/mL}$ ); cetoconazol (0,0039-2,0  $\mu\text{g/mL}$ ); sulfametoxazol e bactrim (300  $\mu\text{g/mL}$ ); e terbinafina (0,0078-4,0  $\mu\text{g/mL}$ ) (tabela 6; ANEXO C, tabelas 7-13). Não houve diferença estatisticamente relevante ( $P > 0,05$ ) entre os valores obtidos para o antifúngico fluconazol a 37 °C (0,25-8,0  $\mu\text{g/mL}$ ) ou à TA (0,5-8,0  $\mu\text{g/mL}$ ).

A  $\text{CIM}_{50}$  e  $\text{CIM}_{90}$  para as amostras testadas em cultivos a temperatura ambiente foram, respectivamente: 0,062 e 0,125  $\mu\text{g/mL}$  para itraconazol; 0,031 e 0,25  $\mu\text{g/mL}$  para cetoconazol; 2,0 e 8,0  $\mu\text{g/mL}$  para fluconazol; e para terbinafina valores de 1 e 2  $\mu\text{g/mL}$ . Encontraram-se valores iguais de  $\text{CIM}_{50}$  e  $\text{CIM}_{90}$  para anfotericina B (1,0  $\mu\text{g/mL}$ ) e para o sulfametoxazol e bactrim (300  $\mu\text{g/mL}$ ). É interessante destacar que para a amostra B339 observou-se um valor de CIM maior que a  $\text{CIM}_{90}$  para o antimicrobiano cetoconazol (2,0  $\mu\text{g/mL}$ ) e a amostra Pb18 apresentou valor de CIM maior que a  $\text{CIM}_{90}$  para terbinafina (4  $\mu\text{g/mL}$ ) (ANEXO C, tabelas 7-13).

Comparando-se valores de  $\text{CIM}_{90}$  em ambas as temperaturas, observaram-se maiores valores de CIM em TA para os antifúngicos itraconazol, cetoconazol, fluconazol e terbinafina. Os antifúngicos anfotericina B, sulfametoxazol e bactrim apresentaram mesmo valor de  $\text{CIM}_{90}$  em ambas as

temperaturas. No entanto, a média geométrica (mgeo) obtida foi maior em 37°C para anfotericina B (0,8763) e a TA para sulfametoxazol e bactrim (300), indicando valores de CIM mais elevados nessas condições para um maior número de amostras (ANEXO C, tabelas 7-13).

### **5.3 Observação da morfologia de amostras de *P. brasiliensis* em diferentes meios de cultura**

Mesmo após o registro das diferenças estatísticas observadas nos valores de CIM obtidos em caldo RPMI a 37°C e à TA, os resultados não configuravam, ainda, determinações exatas das CIMs dos antimicrobianos frente à forma L de *P. brasiliensis*, a forma parasitária do microrganismo. Realizaram-se novas adequações do protocolo, visando testar meios de cultura que permitissem constância da morfologia leveduriforme, a 37°C, ao longo do período de leitura de até 15 dias.

Suplementou-se o meio RPMI com 2% de glicose (concentração presente no meio YPD) com base na hipótese de que a transição da morfologia L para a M pudesse ocorrer devido à baixa concentração de glicose fornecida no meio RPMI (0,2%) (KOHLENER, 2008). Testou-se também o meio MHM por permitir o crescimento de *P. brasiliensis* (RESTREPO & ARANGO, 1980), e por MH ser o meio sugerido pelo CLSI (M100-S18, 2008) para a determinação de CIM de antimicrobianos frente a bactérias.

A observação nos períodos de 2, 5, 10, e 15 dias em RPMI suplementado ou não com glicose (2%) mostrou que a transição morfológica ocorria a partir do 2º dia de incubação, a 37°C, para 13 das 14 amostras analisadas, independentemente da elevação da concentração de glicose, sugerindo que esse não seria o fator influente na alteração morfológica. A observação microscópica de cultivos em caldo MHM, a 37°C, nos mesmos intervalos de leitura, revelou a presença de morfologia caracteristicamente leveduriforme para 14 das 14 amostras testadas (figura 2; ANEXO E, tabela 21). Observou-se no meio MHM, na temperatura ambiente, a presença de morfologia filamentosa para todas as amostras testadas.

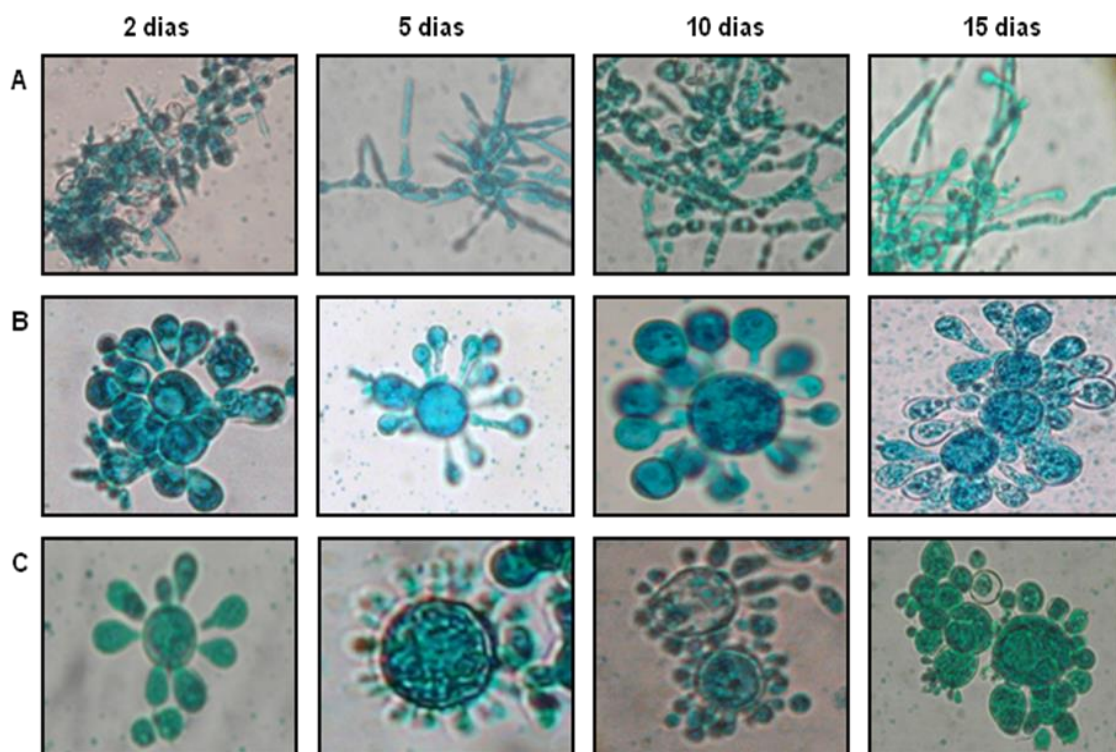


Figura 2: Acompanhamento micromorfológico de amostras de *P. brasiliensis* em diferentes condições experimentais. Cultivaram-se amostras de *P. brasiliensis* em caldo RPMI suplementado com 2% de glicose, caldo MHM, e caldo YPD (controle positivo da morfologia leveduriforme), e incubou-se a 37°C por 15 dias. Em intervalos de 2, 5, 10 e 15 dias, lamina preparadas com 10  $\mu\text{L}$  da cultura e 1  $\mu\text{L}$  de lactofenol foram observadas por microscopia óptica em aumento de 40x. Em **A**: transição de levedura para micélio observada na amostra Pinguim quando cultivada em meio RPMI suplementado com 2% de glicose. **B**: morfologia leveduriforme observada na amostra Pb10 quando cultivada em caldo MHM. **C**: morfologia leveduriforme observada na amostra Pb9 quando cultivada em caldo YPD.

Após essa constatação, realizou-se o ensaio de determinação da CIM dos antimicrobianos propostos frente às 21 amostras de *P. brasiliensis*, utilizando o meio MHM em cultivos a 37°C e à TA, com os intervalos de leitura já definidos.

#### 5.4 Determinação de CIM em caldo MHM

Para o antifúngico itraconazol, a 37°C e à TA, e para cetoconazol e sulfametoxazol, a 37°C, não se registraram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) nos valores de CIM durante os intervalos de leitura de 7, 10 e 15 dias. Para os demais antifúngicos, o tempo de leitura revelou diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ), sendo 15 dias, o período mais confiável para análise dos resultados (ANEXO D, tabelas 14-20).

Exceto para o fluconazol (valores nas faixas de 0,62-1,0 e de 0,62-2,0 µg/mL, respectivamente) (tabela 6), houve diferença estatisticamente significativa nos valores de CIM para as drogas testadas nos cultivos em caldo MHM, a 37°C e à TA ( $P < 0,05$ ) (ANEXO D, tabela 14-20). É interessante observar que apesar da faixa intervalar para este antifúngico apresentar-se ligeiramente mais ampla à TA, a média geométrica das CIM para as 21 amostras a 37°C e à TA foi praticamente igual, correspondendo, respectivamente, a 0,2947 e 0,3362 µg/mL (ANEXO C, tabela 10).

Para anfotericina B encontraram-se valores mais altos de CIM a 37°C (0,125-1,0 µg/mL), em comparação com os obtidos em TA (0,015-0,5 µg/mL), (tabela 6; ANEXO C, tabela 7). Por outro lado, nos cultivos a 37°C não houve diferença significativa nos valores de CIM para o itraconazol (0,0039) e cetoconazol (0,0019) os quais apresentaram apenas pequena variação intervalar nos cultivos à TA (tabela 6; ANEXO C, tabelas 8 e 9).

Valores mais baixos de CIM à 37°C em comparação com aqueles obtidos em TA foram registrados para os antifúngicos sulfametoxazol (valores entre 9,37-150 e de 37,5-300 µg/mL), bactrim (18,75-300 e 75-300 µg/mL) e terbinafina (0,0078-0,25 e 0,062-1,0 µg/mL), respectivamente (tabela 6; ANEXO C, tabelas 11, 12 e 13).

Valores iguais para a CIM<sub>50</sub> e a CIM<sub>90</sub>, a 37°C, foram encontrados para anfotericina B (0,25 µg/mL), itraconazol (0,0039 µg/mL) e cetoconazol (0,0019 µg/mL) (tabela 6 e ANEXO C, tabelas 7-9). Por outro lado, os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, em MHM, a 37°C, foram de, respectivamente, 0,25 e 1,0 µg/mL para fluconazol; 75 e 150 µg/mL para sulfametoxazol e bactrim e de 0,015 e 0,125 µg/mL para terbinafina. Algumas amostras apresentaram valores de CIM maiores do que a CIM<sub>90</sub> para determinados antimicrobianos: Pb03 apresentou CIM de 1,0 µg/mL para anfotericina B; Pb09 teve CIM de 300 µg/mL para bactrim e os isolados 1578 e Pb9 apresentaram CIM de 0,25 µg/mL para terbinafina.

Os valores de CIM<sub>50</sub> e a CIM<sub>90</sub> obtidos em MHM, à TA, foram de, respectivamente: 0,031 e 0,25 µg/mL para anfotericina B, constatando-se para a CIM<sub>50</sub> um valor inferior ao observado a 37°C; 0,0039 e 0,031 µg/mL para itraconazol; 0,0019 e 0,0039 µg/mL para cetoconazol; 0,25 e 2,0 para fluconazol; 150 e 300 para sulfametoxazol e bactrim; 0,125 e 0,25 µg/mL para terbinafina. A amostra ambiental Pinguim apresentou valor de CIM maior do que a CIM<sub>90</sub> para anfotericina B (0,5 µg/mL), cetoconazol (0,0078 µg/mL) e terbinafina (1,0 µg/mL). A amostra Pb4 apresentou valor de CIM maior que o da CIM<sub>90</sub> para itraconazol (0,125 µg/mL) e cetoconazol (0,0078 µg/mL). Observaram-se, ainda, maiores valores de CIM<sub>90</sub> para a amostra Pb09 em terbinafina (0,5 µg/mL) e para Pb18 em itraconazol (0,062 µg/mL) (ANEXO C, tabelas 7-13).

Comparando-se os valores de CIM<sub>90</sub> em MHM a 37°C e em TA verificou-se, exceto para anfotericina B onde não ocorreu diferença nos valores de CIM<sub>90</sub>, que maiores valores foram registrados em TA para os demais antifúngicos testados. Apesar de não haver diferença nos valores de CIM<sub>90</sub> para anfotericina B, a mgeo (0,2191) indica maiores valores de CIM em amostras testadas a 37°C.

Quando se comparou os valores de CIM<sub>90</sub> nos meios RPMI e MHM em ambas as temperaturas, observou-se que maiores valores de CIM<sub>90</sub> são observados em meio RPMI independente da temperatura de incubação.

Houve diferença estatisticamente significativa quando se compararam os valores de CIM obtidos em caldo MHM com aqueles obtidos em caldo RPMI,

em ambas as temperaturas ( $P < 0,005$ ) (ANEXO D, tabelas 14-20), obtendo-se valores mais elevados em caldo RPMI para as 21 amostras de *P. brasiliensis* testadas tanto a 37°C quanto em TA. De modo geral os valores de CIM determinados para sulfametoxazol e bactrim, nos dois meios (RPMI e MHM), tanto a 37°C quanto à temperatura ambiente, foram mais similares (tabela 6; ANEXO F, tabelas 22 e 23). A 37°C, também foram similares nos dois meios os valores observados para itraconazol e cetoconazol (tabela 6; ANEXO F, tabela 22). Já, à TA, os valores de CIM nos dois meios foram mais similares para terbinafina (tabela 6; ANEXO F, tabela 23).

### 5.5 Determinação de CIM em caldo MVM

Empregou-se, também, o caldo MVM, previamente utilizado para ensaios de determinação de CIM pela técnica de macrodiluição (HAHN & HAMDAN, 2000 (a e b); HAHN et al, 2002; da SILVA et al., 2006), visando a comparação com os resultados obtidos nos caldos RPMI e MHM.

Houve diferença estatisticamente significativa nos valores de CIM em cultivos a 37°C e TA para todos os antifúngicos e amostras analisados ( $P < 0,05$ ) (ANEXO D, tabelas 14-20). A observação microscópica das amostras ao final dos ensaios de determinação de CIM indicou a estabilidade das morfologias leveduriforme a 37°C e filamentosa em TA.

Não houve variação significativa ( $P > 0,05$ ) dos valores de CIM a 37°C durante os intervalos de leitura de 7, 10 e 15 dias para fluconazol e sulfametoxazol; entre 10 e 15 dias para cetoconazol; e entre 7 e 10 dias para bactrim. Observou-se ainda, que o crescimento das amostras foi menor ou mais lento quando comparado com aquele alcançado nos ensaios em que se usaram os meios RPMI ou MHM, dificultando a leitura de resultados. Apenas para as amostras Pb6, Utero e Pb14 registrou-se visualmente crescimento com 7 dias de incubação em itraconazol, cetoconazol e terbinafina, a 25°C. Ainda, para Pb6 e Utero observou-se crescimento aos 7 dias nos controles dos ensaios à TA. Para as outras amostras, não foi observado crescimento neste período, mesmo nos controles dos testes, registrando-se crescimento a partir do 10º dia de incubação. Com os demais antifúngicos, a 37°C, e para todos em TA, o período de leitura de 7, 10 e 15 dias forneceu considerável variação

estatística ( $P < 0,05$ ), sendo, por isso, a leitura de 15 dias mais confiável para análise dos resultados (ANEXO D, tabelas 14-20).

Registraram-se valores de CIM a 37°C para itraconazol numa faixa mais ampla (0,0039-0,25 µg/mL) do que os registrados em TA (0,0039-0,125 µg/mL). Para a terbinafina, ao contrário, apesar da faixa de CIM obtida em cultivos à temperatura ambiente ter sido mais ampla (0,031-2,0 µg/mL; 0,0078-1,0 µg/mL) os valores de CIM para as amostras, à TA, foram, em geral, menores do que aqueles observados a 37°C. Por outro lado, obtiveram-se valores respectivamente mais baixos de CIM nos ensaios a 37°C do que à TA para anfotericina B (0,0078-2,0 µg/mL; 0,031-2,0 µg/mL), cetoconazol (0,0019-0,031 µg/mL; 0,0078-0,062 µg/mL), fluconazol (0,0078-2,0 µg/mL; 0,031-4,0 µg/mL), sulfametoxazol (1,17-18,75 µg/mL; 9,37-37,5 µg/mL) e bactrim (1,17-18,75 µg/mL; 1,17-75,0 µg/mL). (tabela 6; ANEXO C, tabelas 7-13; ANEXO F, tabelas 22 e 23).

A CIM<sub>50</sub> e a CIM<sub>90</sub> encontradas a 37°C foram, respectivamente: 0,5-2,0 µg/mL para anfotericina B; 0,0078-0,25 µg/mL para itraconazol; 0,0078-0,031 µg/mL para cetoconazol; 1,0-2,0 µg/mL para fluconazol; 4,68-18,75 µg/mL para sulfametoxazol e bactrim, e 0,5-1,0 µg/mL para terbinafina. Os valores de CIM<sub>50</sub> e a CIM<sub>90</sub> a temperatura ambiente foram respectivamente: 1,0-2,0 µg/mL para anfotericina B; 0,031-0,125 µg/mL para itraconazol; 0,062 µg/mL para cetoconazol; 0,25-4,0 µg/mL para fluconazol; 9,37-37,5 µg/mL para sulfametoxazol, 9,37-75 µg/mL para bactrim e 0,062-1,0 µg/mL para terbinafina; (tabela 6; ANEXO B, tabelas 7-13). Observou-se ainda, que 6 amostras apresentaram CIM de 2,0 µg/mL para anfotericina B à TA: B339, Pb11, Pb9, Pb8, Tatu e Pinguim, e esse mesmo valor de CIM (2 µg/mL), foi obtido frente à amostra Pb14, a 37°C.

Houve diferença estatisticamente significativa quando foram comparados os valores de CIM obtidos em caldo MVM com aqueles obtidos em caldo RPMI, em ambas as temperaturas ( $P < 0,05$ ) (ANEXO D, tabelas 14-20). Obtiveram-se valores, em geral, mais elevados em caldo RPMI tanto a 37°C quanto à TA. Para anfotericina B, por exemplo, observou-se uma faixa mais ampla de valores de CIM a 37°C (0,0078–2,0 µg/mL x 0,25-2,0 µg/mL, respectivamente) e uma mgeo inferior (0,2235 x 0,8703). Registraram-se, a 37°C, valores de CIM

em caldo MVM mais similares aos observados em caldo RPMI para os antifúngicos itraconazol (0,0039-0,25 µg/mL x 0,0039-0,062 µg/mL respectivamente), e cetoconazol (0,0019-0,031 µg/mL) (tabela 6; ANEXO C, tabelas 8 e 9). Para fluconazol, também a 37°C, os valores observados em MVM foram inferiores (0,0078-2,0 µg/mL x 0,25-8,0 µg/mL respectivamente) e para terbinafina observaram-se valores numa faixa mais ampla (0,0078-1,0 µg/mL x 0,125-0,5 µg/mL) (tabela 6; ANEXO C, tabelas 10 e 13).

À TA, os valores de CIM observados no caldo MVM comparativamente aos obtidos em caldo RPMI foram mais similares para anfotericina B (0,031-2,0 µg/mL x 0,25-1,0 µg/mL respectivamente), itraconazol (0,0039-0,125 x 0,0078 - 0,125 µg/mL) e cetoconazol (0,078-0,062 x 0,0039 - 2,0 µg/mL) ao final de 15 dias de incubação (tabela 6, ANEXO D, tabelas 14-20; ANEXO F, tabelas 22 e 23).

Exceto quando se compararam valores de CIM obtidos a 37°C para fluconazol em caldo MHM e MVM, houve diferença estatisticamente significativa nos valores de CIM obtidos em caldo MVM com aqueles obtidos em caldo RPMI e MHM, em ambas as temperaturas ( $P < 0,05$ ) (ANEXO D, tabelas 14-20).

Os valores de CIM dos antifúngicos sulfametoxazol e bactrim em MVM foram consideravelmente mais baixos em comparação com valores obtidos quando se usou o meio RPMI ou MHM. Registraram-se, para algumas amostras, valores de CIM bastante divergentes nos cultivos a 37°C e a TA para esses antifúngicos. Registraram-se valores de CIM mais baixos para sulfametoxazol a 37°C para as amostras Pb6 e Pb14 (4,68 µg/mL) e Utero (1,17 µg/mL) comparativamente aqueles observados à TA (37,5 µg/mL). As amostras Pinguim, Pb18 e Pb09 exibiram valores de CIM mais altos a 37°C (18,75 µg/mL) quando comparados com os valores a TA (1,17 µg/mL para Pinguim e Pb18; 4,68 µg/mL para Pb09). As amostras Utero e Pb14 exibiram valores mais altos de CIM a 25°C (75 µg/mL) em comparação com os valores a 37°C (1,17 µg/mL e 4,68 µg/mL, respectivamente) para bactrim (ANEXO C, tabelas 7-13).



## 5.6 Efeitos da adição de MTT nas determinações de CIM

Os valores comparativos de determinação de CIM por MTT para anfotericina B e itraconazol encontram-se listados nas tabelas 24 e 25 respectivamente.

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) nos valores de CIM fornecidos por leitura visual e leitura por absorbância com MTT para os antifúngicos anfotericina B e itraconazol frente às amostras de *P. brasiliensis* e os intervalos de leitura testados. No entanto, os valores de CIM obtidos por leitura visual e por absorbância variaram para algumas amostras. Registrou-se para anfotericina B, frente a amostra Pb03, um valor menor de CIM por absorbância (0,062  $\mu\text{g/mL}$ ) do que por leitura visual (0,25  $\mu\text{g/mL}$ ); e para a amostra Pb6, um maior valor de CIM por absorbância (1,0  $\mu\text{g/mL}$ ) que por leitura visual (0,25  $\mu\text{g/mL}$ ), ao final de 15 dias. Para itraconazol, para a amostra Pb01, observou-se um maior valor de CIM em leitura visual (0,031  $\mu\text{g/mL}$ ) em comparação com a CIM obtida por absorbância (0,0078  $\mu\text{g/mL}$ ) e para a amostra Pb18, um maior valor de CIM por absorbância (0,062  $\mu\text{g/mL}$ ) do que pela leitura visual (0,015  $\mu\text{g/mL}$ ), ao final de 15 dias.

## 5.7 Análises da ação fungicida ou fungistática dos antimicrobianos durante o ensaio de determinação de CIM

A atividade fungicida ou fungistática dos antifúngicos frente a *P. brasiliensis* encontra-se sintetizada na tabela 26 e exemplificada na figura 3.

Evidenciou-se a atividade fungicida para anfotericina B em cultivos oriundos tanto de RPMI quanto de MHM (100% para ambos); a atividade fungicida foi também predominante para itraconazol (57% em RPMI e 100% em MHM), para sulfametoxazol (62% em RPMI e 66% em MHM) e para bactrim (52% em RPMI e 71% em MHM). As divergências ocorreram nos antifúngicos fluconazol e terbinafina. Para fluconazol, registrou-se maior atividade fungistática em amostras oriundas de RPMI (57%) e fungicida em amostras

Tabela 24: Comparação entre o valor de CIM determinado por leitura visual e por leitura com MTT por absorbância de ensaio para Anfotericina B em RPMI a 37°C

| <b>Anfotericina B (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> |               |               |                |                  |                |                |
|---|---------------|---------------|----------------|------------------|----------------|----------------|
| <b>Amostras</b>                                     | <b>Visual</b> |               |                | <b>MTT (Abs)</b> |                |                |
|   | <b>7dias</b>  | <b>10dias</b> | <b>15 dias</b> | <b>7 dias</b>    | <b>10 dias</b> | <b>15 dias</b> |
| Ed01  | 0,125         | 0,25          | 0,5            | 0,015            | 0,25           | 0,25           |
| 1578  | 0,125         | 0,25          | 0,5            | 0,062            | 0,125          | 0,25           |
| Pb01  | 0,062         | 0,25          | 0,25           | 0,25             | 0,25           | 0,25           |
| Pb03  | 0,125         | 0,25          | 0,25           | 0,015            | 0,062          | 0,062          |
| Pb6   | 0,062         | 0,25          | 0,25           | 0,062            | 1,0            | 1,0            |
| Pb14  | 0,062         | 0,25          | 0,25           | 0,062            | 0,062          | 0,125          |
| Tatu  | 0,062         | 0,125         | 0,125          | 0,031            | 0,125          | 0,125          |
| Pb18  | 0,062         | 0,25          | 0,25           | 0,031            | 0,125          | 0,25           |

Legenda:

Abs\_ absorbância

Tabela 25: Comparação entre o valor de CIM determinado por leitura visual e por leitura com MTT por absorvância de ensaio de determinação de CIM para itraconazol em RPMI a 37°C

| <b>Itraconazol (µg/mL)</b> |               |               |                |                  |                |                |
|----------------------------|---------------|---------------|----------------|------------------|----------------|----------------|
| <b>Amostras</b>            | <b>Visual</b> |               |                | <b>MTT (Abs)</b> |                |                |
|                            | <b>7dias</b>  | <b>10dias</b> | <b>15 dias</b> | <b>7 dias</b>    | <b>10 dias</b> | <b>15 dias</b> |
| Ed01                       | 0,0078        | 0,0078        | 0,0078         | 0,0039           | 0,0039         | 0,0078         |
| 1578                       | 0,015         | 0,015         | 0,015          | 0,031            | 0,031          | 0,031          |
| Pb01                       | 0,031         | 0,031         | 0,031          | 0,0078           | 0,0078         | 0,0078         |
| Pb11                       | 0,0039        | 0,0039        | 0,0039         | 0,0078           | 0,0078         | 0,0078         |
| Tatu                       | 0,0039        | 0,0078        | 0,0078         | 0,0078           | 0,0078         | 0,0078         |
| Pb18                       | 0,0078        | 0,015         | 0,015          | 0,015            | 0,062          | 0,062          |

Legenda:

Abs\_ absorvância

Tabela 26: Síntese da atividade Fungicida (Fc) ou Fungistática (Fe) de antifúngicos frente a 21 amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* vindos do ensaio de determinação de CIM com os meios RPMI e MMH à 37°C

| Meios        | Anfotericina B                 |                                | Itraconazol                    |                                | Fluconazol                     |                                | Sulfamethoxazol                |                                | Bactrim®                       |                                | Terbinafina                    |                                |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|              | RPMI                           | MHM                            | RPMI                           | MHM                            | RPMI                           | MHM                            | RPMI                           | MHM                            | RPMI                           | MHM                            | RPMI                           | MHM                            |
| <b>Total</b> | <b>100% Fc</b><br><b>0% Fe</b> | <b>100% Fc</b><br><b>0% Fe</b> | <b>57% Fc</b><br><b>43% Fe</b> | <b>100% Fc</b><br><b>0% Fe</b> | <b>43% Fc</b><br><b>57% Fe</b> | <b>52% Fc</b><br><b>48% Fe</b> | <b>62% Fc</b><br><b>38% Fe</b> | <b>66% Fc</b><br><b>33% Fe</b> | <b>52% Fc</b><br><b>48% Fe</b> | <b>71% Fc</b><br><b>29% Fe</b> | <b>57% Fc</b><br><b>43% Fe</b> | <b>48% Fc</b><br><b>52% Fe</b> |

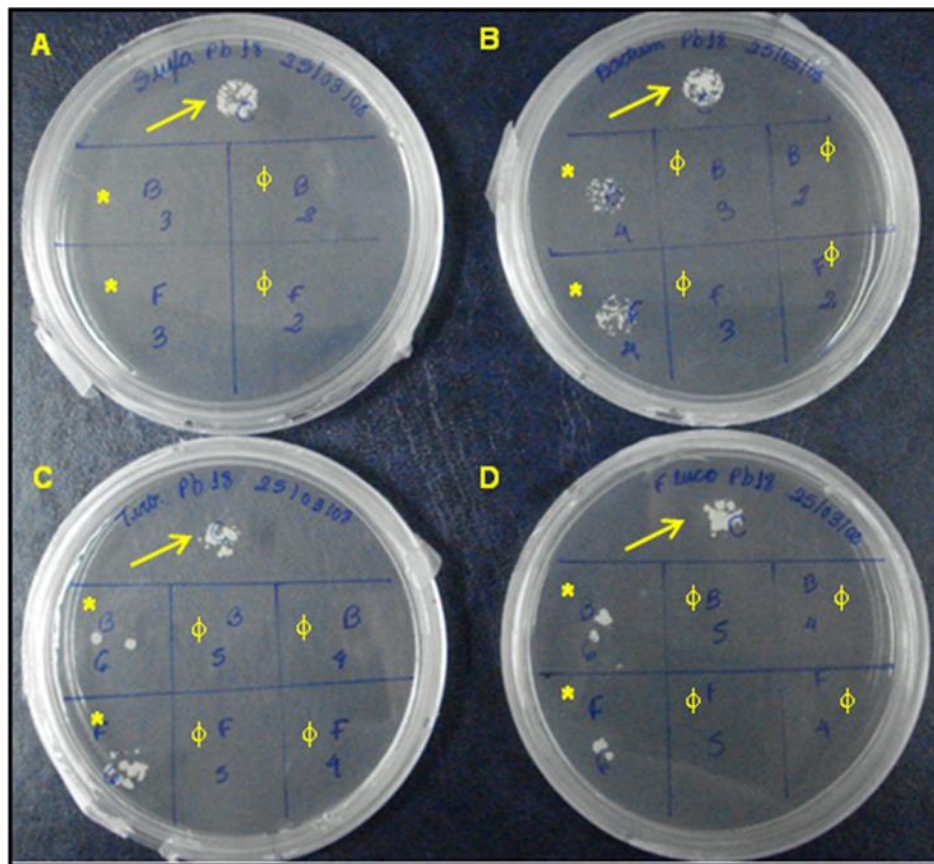


Figura 3: Ação fungicida ou fungistática de antimicrobianos para a amostra Pb18. Ao final do experimento de determinação de CIM para sulfametoxazol (A), bactrim (B), terbinafina (C) e fluconazol (D), retiraram-se 10  $\mu$ L da cultura da amostra Pb18 oriundas do orifício controle das placas de microtitulação (setas), do orifício correspondente ao valor da CIM (\*) e de duas concentrações acima deste valor ( $\phi$ ), semeando-se em ágar YPD. As placas foram incubadas a 37°C durante 15 dias. Considerou-se atividade fungicida a ausência de crescimento das amostras (A) e atividade fungistática o crescimento residual e contínuo das amostras em ágar YPD (B, C e D). Setas: controle positivo de crescimento.

oriundas de MHM (52%); para terbinafina, observou-se atividade fungicida para amostras provenientes de RPMI (57%) e fungistática em MHM (52%).

Algumas divergências puderam ser observadas quanto à caracterização de ação predominantemente fungistática para fluconazol nas amostras Utero, Pb11, Pb18 e Pb14 quando oriundas de RPMI e fungicida quando eram oriundas de MHM; a ação foi fungicida nas amostras Pb09, Tatu e Pb8 quando oriundas de RPMI e fungistática quando provenientes de MHM. O antifúngico terbinafina mostrou-se fungistático para as amostras Ed01, Pb11, Pb10 e Pb9 quando retiradas de RPMI e fungicida quando retiradas de MHM; a ação foi fungicida para as amostras 1578, Pb01, Pb2, Pb09, Pb8 e Pinguim quando provenientes de RPMI e fungistática quando originadas de MHM. Já sulfametoxazol mostrou-se fungistático para as amostras Pb01, Pb03, Pb11, Pb14 e Pinguim oriundas de RPMI e fungicida para aquelas vindas de MHM; fungicida para Pb13, Pb9 e Pb8 retiradas de RPMI e fungistática a partir de MHM. O bactrim mostrou-se fungistático para as amostras 1578, Pb03, Pb5, Pb18 e Utero quando provenientes de RPMI e fungicida quando oriundas de MHM; fungicida para Pb09 e Pb8 vindas de RPMI e fungistático quando retiradas de MHM (ANEXO G, tabela 27).

## **5.8 Determinações de CIM por incorporação em ágar RPMI**

Compararam-se os valores previamente obtidos em caldo RPMI, a 37°C, com aqueles observados em meio RPMI sólido, na mesma temperatura, visando possibilitar o emprego do meio sólido na seleção de subpopulações de *P. brasiliensis* em concentrações crescentes de antifúngicos. Os valores de CIM obtidos em ágar RPMI a 37°C encontram-se sumarizados na tabela 28 e exemplificados na figura 4.

Ao contrário do observado em meio líquido quando 81% das amostras se converteu de L para M, apenas em 3 amostras (Pb4, Pb11 e Tatu) visualizou-se, macroscopicamente, a transição da forma L para a M ao longo do experimento, independentemente da presença de antifúngico, correspondendo a 14% do total de amostras analisadas. Ao final de 15 dias, a observação microscópica confirmou a completa transição da forma L para M nessas amostras (figura 5).

Tabela 28: Análise comparativa dos valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) resultantes de ensaios de determinação em meio RPMI caldo e ágar RPMI, à 37°C

| Amostras                      | Anfotericina B |              | Itraconazol   |               | Fluconazol |            | Sulfametoxazol |              |
|-------------------------------|----------------|--------------|---------------|---------------|------------|------------|----------------|--------------|
|                               | caldo          | ágar         | caldo         | ágar          | caldo      | ágar       | caldo          | ágar         |
| Ed01                          | 1,0            | 0,062        | 0,015         | 0,0039        | 2,0        | 1,0        | 300            | 300          |
| 1578                          | 0,5            | 0,031        | 0,031         | 0,0039        | 0,5        | 1,0        | 300            | 150          |
| Pb01                          | 1,0            | 0,062        | 0,0078        | 0,0039        | 0,5        | 0,125      | 150            | 150          |
| Pb4                           | 1,0            | 0,031        | 0,062         | 0,0039        | 8,0        | 8,0*       | 300            | 600          |
| Pb2                           | 0,25           | (-)          | 0,0078        | 0,0039        | 0,5        | 0,25       | 150            | 300          |
| Pb03                          | 1,0            | 0,031        | 0,015         | 0,0039        | 2,0        | 8,0        | 300            | 300          |
| Pb6                           | 1,0            | 0,015        | 0,0078        | 0,0039        | 0,5        | 2,0        | 300            | 150          |
| Pb5                           | 1,0            | 0,0078       | 0,015         | 0,0039        | 1,0        | 0,5        | 300            | 300          |
| B339                          | 1,0            | 0,015        | 0,0039        | 0,0039        | 0,5        | 1,0        | 150            | 300          |
| Utero                         | 1,0            | 0,031        | 0,0039        | 0,0039        | 0,5        | 1,0        | 300            | 150          |
| Pb11                          | 0,5            | 0,015        | 0,062         | 0,0039        | 8,0        | 1,0        | 150            | 150          |
| Pb13                          | 0,25           | 0,015        | 0,0039        | 0,0039        | 0,25       | 0,5        | 150            | 300          |
| Pb10                          | 1,0            | 0,015        | 0,0078        | 0,0039        | 2,0        | 2,0        | 150            | 300          |
| Pb14                          | 2,0            | 0,031        | 0,0078        | 0,0039        | 0,5        | 1,0        | 300            | 600          |
| 63265                         | 1,0            | 0,015        | 0,0078        | 0,0039        | 0,5        | 0,125      | 300            | 150          |
| Pb09                          | 1,0            | 0,031        | 0,062         | 0,0039        | 1,0        | 0,5        | 300            | 600          |
| Pinguim                       | 1,0            | 0,062        | 0,0039        | 0,031         | 2,0        | 1,0        | 300            | 600          |
| Tatu                          | 1,0            | 0,015        | 0,0078        | 0,0039        | 1,0        | 1,0        | 300            | 300          |
| Pb9                           | 2,0            | 0,015        | 0,015         | 0,0039        | 1,0        | 0,25       | 300            | 600          |
| Pb8                           | 1,0            | 0,0078       | 0,062         | 0,0039        | 1,0        | 0,5        | 300            | 300          |
| Pb18                          | 1,0            | 0,015        | 0,0039        | 0,0039        | 0,25       | 0,5        | 300            | 300          |
| <b>CIM<sub>50</sub></b>       | <b>1,0</b>     | <b>0,015</b> | <b>0,0078</b> | <b>0,0039</b> | <b>1,0</b> | <b>1,0</b> | <b>300,0</b>   | <b>300,0</b> |
| <b>CIM<sub>90</sub></b>       | <b>1,0</b>     | <b>0,062</b> | <b>0,062</b>  | <b>0,0039</b> | <b>2,0</b> | <b>2,0</b> | <b>300,0</b>   | <b>600,0</b> |
| Méd.geom.( $\mu\text{g/mL}$ ) | 0,8763         | 0,0216       | 0,0119        | 0,0043        | 0,9361     | 0,7937     | 246,1006       | 290,2595     |

Legenda:

Méd.geom. \_ média geométrica

(-) \_ ausência de crescimento

\* \_ 100% de inibição

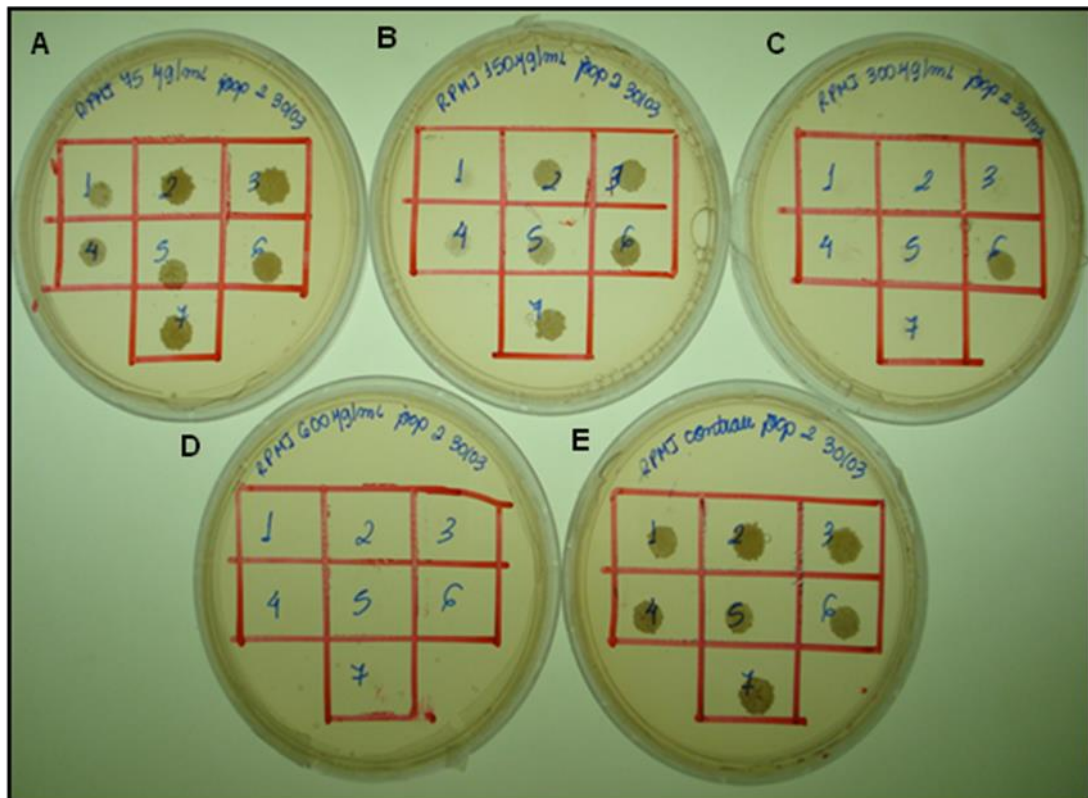


Figura 4: Documentação fotográfica representativa de um ensaio de determinação de CIM por incorporação em ágar. Semeou-se uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  do inóculo ( $1-5 \times 10^4$  células) em ágar RPMI contendo ou não sulfametoxazol. As placas foram incubadas a 37°C durante 15 dias para posterior leitura dos resultados constando-se presença ou ausência de crescimento. Em **A**: Ágar RPMI contendo 75  $\mu\text{g/mL}$  de sulfametoxazol; em **B**: Ágar RPMI com 150  $\mu\text{g/mL}$  de sulfametoxazol; em **C**: Ágar RPMI contendo 300  $\mu\text{g/mL}$  de sulfametoxazol; em **D**: Ágar RPMI com 600  $\mu\text{g/mL}$  de sulfametoxazol; em **E**: Ágar RPMI sem antimicrobiano (controle positivo). Números 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7: amostras Pb11, Pb10, Pb13, 1578, Pb8, Pb14 e ED01 respectivamente.



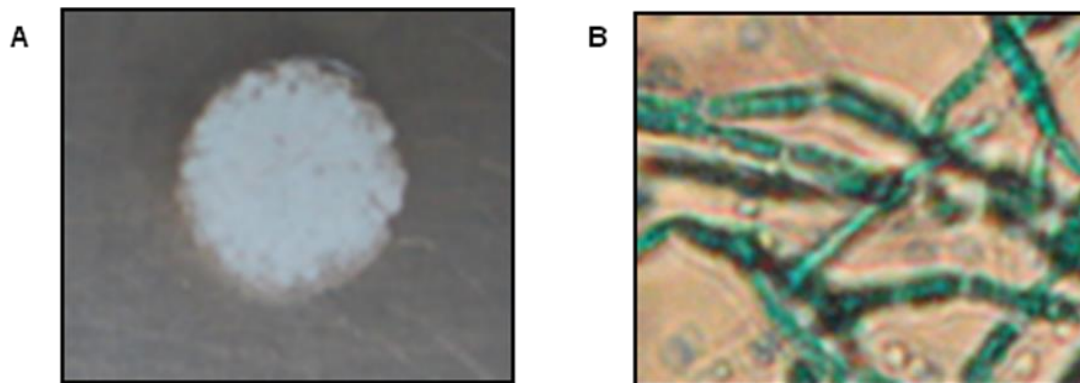


Figura 5: Morfologia da amostra Pb4 ao final do ensaio de determinação da CIM por incorporação em ágar. Amostra cultivada à 37°C por 15 dias em Agar RPMI. Em **A**: morfologia filamentosa macroscópica apresentando colônia de coloração branca e aspecto aveludado após 15 dias de incubação. Em **B**: morfologia filamentosa da mesma amostra observada por microscopia óptica em aumento de 40X após 15 dias de incubação. Lâmina preparada com 10  $\mu$ L da suspensão fúngica e 1  $\mu$ L de lactofenol .

Para anfotericina B, observou-se ausência de crescimento em ágar RPMI quando se testaram os valores de referência obtidos no ensaio de determinação de CIM em caldo, o que indicava valores de CIM inferiores a 0,125 µg/mL, a menor concentração testada inicialmente. Realizaram-se novos experimentos usando uma faixa intervalar entre 0,0078-0,25 µg/mL do antifúngico.

Os resultados mostraram que em ágar RPMI os valores de CIM foram mais baixos (0,0078 – 0,062 µg/mL) do que aqueles definidos por microdiluição em caldo (0,25-2 µg/mL), significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Não houve variação entre CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> em caldo. No entanto, os valores foram diferentes em ágar RPMI registrando-se CIM<sub>50</sub> = 0,015 µg/mL e CIM<sub>90</sub> = 0,062 µg/mL.

Os valores de CIM para itraconazol obtidos em ágar RPMI (0,0039-0,031 µg/mL) foram significativamente mais baixos ( $P < 0,05$ ) do que aqueles obtidos por microdiluição (0,0039-0,062 µg/mL). Não houve variação entre a CIM<sub>50</sub> e a CIM<sub>90</sub> para itraconazol em ágar RPMI, a qual correspondeu a 0,0039 µg/mL.

Para o fluconazol, observou-se que os valores de CIM para caldo (0,25-8,0 µg/mL) e ágar (0,125-8,0 µg/mL) são estatisticamente equivalentes ( $P > 0,05$ ). A CIM<sub>50</sub> e a CIM<sub>90</sub> foram as mesmas encontradas tanto em caldo como em ágar RPMI (1,0 e 2,0 µg/mL respectivamente). Verificou-se que algumas amostras apresentaram valores de CIM muito divergentes entre as condições testadas: Pb11 apresentou CIM de 8,0 µg/mL em caldo e 1,0 µg/mL em ágar e Pb03 apresentou CIM de 8,0 µg/mL em ágar e 2,0 µg/mL em caldo. A amostra Pb4 exibiu o mesmo valor de CIM nas duas situações (8,0 µg/mL), no entanto, o antifúngico agiu como fungicida em ágar e fungistático em caldo RPMI.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores obtidos em ágar (150-600 µg/mL) com aqueles obtidos em caldo (150-300 µg/mL) para sulfametoxazol ( $P > 0,05$ ). No entanto, a CIM obtida em ágar foi de 600 µg/mL para 5 amostras: Pb4, Pb14, Pb9, Pb09 e Pinguim evidenciando-se ação fungicida da droga nestas amostras; com crescimento semelhante ao do controle nas placas com 300 µg/mL e ausência de crescimento em placas com 600 µg/mL de sulfametoxazol. Com base nesta leitura, presumiu-se que a CIM

desse antimicrobiano para as 5 amostras mencionadas deva estar entre 300 e 600  $\mu\text{g/mL}$  havendo a necessidade de experimentos adicionais para sua determinação. Houve variação nos valores de  $\text{CIM}_{50}$  e a  $\text{CIM}_{90}$  em ágar (300 e 600  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente), e ausência de variação em caldo (300  $\mu\text{g/mL}$ ).

## **5.9 Seleção de subpopulações de *P. brasiliensis* em concentrações crescentes de antifúngicos**

### 5.9.1 Escolha dos antifúngicos e de amostras de *P. brasiliensis*

Após a determinação da CIM para as amostras de *P. brasiliensis*, aquelas que apresentaram os maiores valores de CIM foram utilizadas para a seleção de subpopulações em concentrações crescentes de antifúngicos e, sempre que possível, contemplando amostras representativas de espécies filogenéticas diferentes (S1, PS2 e “Pb01-like”) (tabela 1).

Inicialmente, quatro antifúngicos foram escolhidos: itraconazol, fluconazol, sulfametoxazol e bactrim; antifúngicos comumente utilizados, em associação ou não, no tratamento da PCM.

Para seleção em itraconazol escolheram-se os isolados Pb4, Pb11 e Pb03. Os dois primeiros apresentando CIM de 0,062  $\mu\text{g/mL}$  e o último, CIM de 0,015  $\mu\text{g/mL}$  em RPMI a 37°C.

Os isolados escolhidos para seleção em fluconazol foram Pb4, apresentando CIM de 8  $\mu\text{g/mL}$ ; Ed01(CIM de 2  $\mu\text{g/mL}$ ) e a amostra Tatu (CIM de 1  $\mu\text{g/mL}$ ).

Para seleção em sulfametoxazol e bactrim utilizaram-se as amostras Pb4, Pb03, Pb18, Ed01 e Tatu. À exceção da amostra Pb18, que apresentou CIM de 150  $\mu\text{g/mL}$  para bactrim, todas as demais apresentaram CIM de 300  $\mu\text{g/mL}$  para esses antifúngicos.

### 5.9.2 Escolha do meio de cultura para o ensaio de seleção

Testaram-se as 21 amostras de *P. brasiliensis* para crescimento em ágar MHM e MVM objetivando a escolha do melhor meio para seleção de

subpopulações de *P. brasiliensis* utilizando-se como controle negativo, o ágar MH e como controle positivo de crescimento, o ágar YPD.

O acompanhamento do crescimento das amostras de *P. brasiliensis* em diferentes meios de cultura encontra-se mostrado no anexo H, tabela 29.

Das 21 amostras testadas, 13 cresceram em MH, sem sustentação do crescimento após sucessivos repiques.

A princípio, todas as amostras cresceram no 1º repique em MHM e 19 até o 2º repique. Apenas duas amostras, Pb5 e Pb4, apresentaram bom crescimento até o 3º mostrando-se, sucessivamente, insatisfatório até o 5º repique. A figura 6 ilustra o acompanhamento de repiques sucessivos com a amostra Ed01. Apenas 2 amostras (Pb6 e 1578) mantiveram-se viáveis até o 3º repique em meio não suplementado. Os resultados sugerem que o meio MHM torna-se inadequado para uso em seleção de subpopulações de *P. brasiliensis* uma vez que são necessários repiques sucessivos quando se utiliza a técnica de MP.

No meio MVM, observou-se que 20 das 21 amostras foram capazes de crescer até o segundo repique sucessivo nesse meio, e dentre elas, 18 mantiveram-se viáveis a partir dos 3º e 4º repiques (figura 7). No entanto, 3 das amostras previamente selecionadas (Pb6, Ed01 e Pb4) mostraram um decréscimo no crescimento a partir do 4º repique neste meio. Diante dos resultados insatisfatórios observados nesses meios, optou-se por realizar a seleção mediante a incorporação das drogas em Agar YPD nas concentrações predefinidas em meio RPMI.

Uma vez que as concentrações iniciais utilizadas no processo de seleção em sulfametoxazol e para validar o emprego do ágar YPD visando sua utilização no processo seletivo de subpopulações, realizou-se uma análise comparativa dos valores de CIM obtidos em caldo e ágar RPMI e em ágar YPD a 37°C (ANEXO I, tabela 30).

Houve diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) quando se compararam os valores de CIM obtidos para as 21 amostras de *P. brasiliensis* em ágar RPMI com os obtidos em ágar YPD para sulfametoxazol. Registraram-se maiores valores de CIM em ágar RPMI (150-600 µg/mL) em comparação com ágar YPD (75-600 µg/mL). Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ )

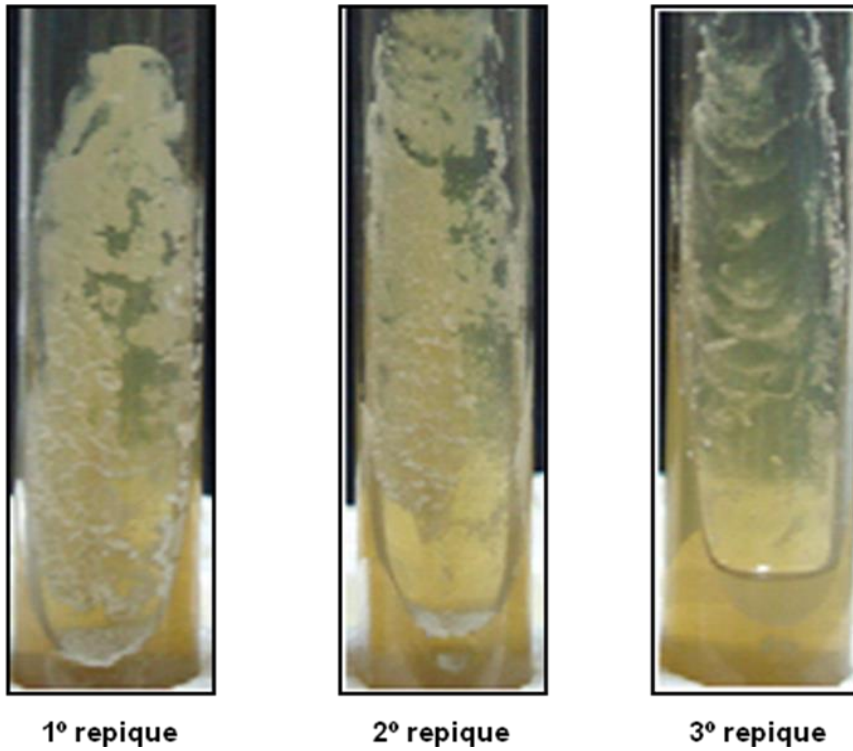


Figura 6: Acompanhamento do crescimento da amostra Ed01 em MHM a 37°C. A amostra Ed01 foi semeada em ágar MHM e incubada a 37°C por 15 dias. A foto mostra a redução gradual no crescimento da amostra após 3 repiques sucessivos.

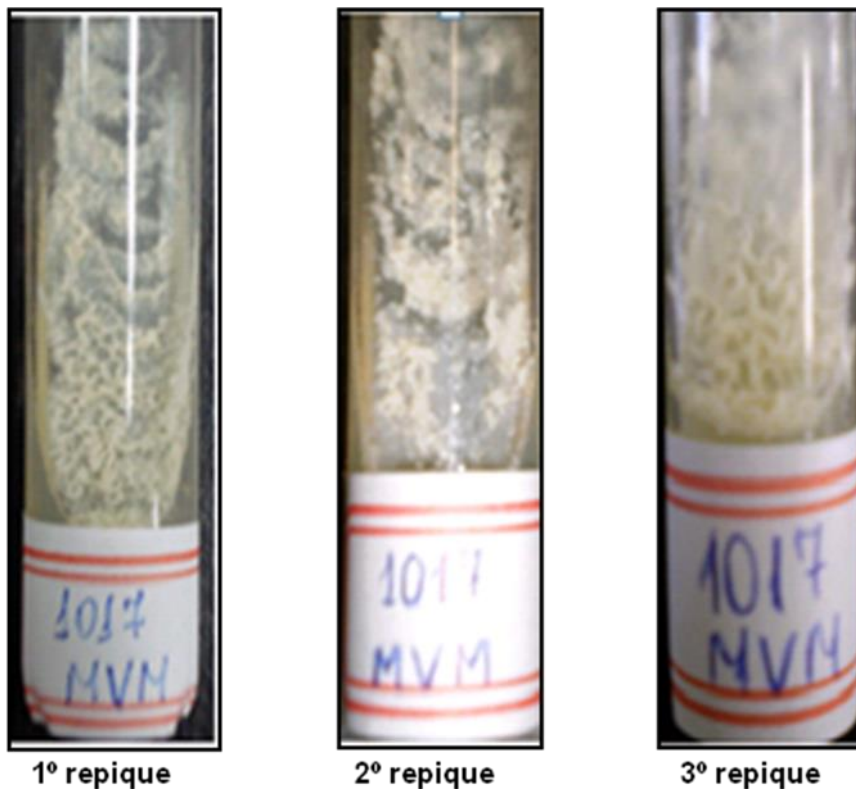


Figura 7: Acompanhamento do crescimento da amostra Pb4 (1017) em MVM a 37°C. A amostra Pb4 (1017) foi semeada em ágar MVM e incubada a 37°C por 15 dias. A foto mostra a continuidade do crescimento da amostra após 3 repiques sucessivos.

quando se compararam valores obtidos em caldo RPMI com os obtidos em ágar YPD.

### 5.9.3 Seleção de subpopulações de *P. brasiliensis* a 37°C, tolerantes a concentrações crescentes de antifúngicos

Não foi possível, por PU, selecionar subpopulações de *P. brasiliensis* para os antifúngicos itraconazol, sulfametoxazol e bactrim nas concentrações iniciais utilizadas (valor da CIM para itraconazol e 600 e 900 µg/mL para sulfametoxazol e bactrim).

Para o antifúngico fluconazol, a seleção em concentração inicial de duas vezes o valor da CIM não possibilitou o isolamento de clones de nenhuma das amostras testadas. Optou-se por utilizar o valor da CIM de cada amostra como concentração inicial para seleção. Não houve seleção de subpopulações da amostra Pb4 em 8 µg/mL. Tentou-se então, para essa amostra, uma concentração sub inibitória de 7 µg/mL, de novo sem resultados positivos. Um total de 7 clones da amostra ED01 e 6 clones da amostra Tatu cresceram em 2 e 1 µg/mL, respectivamente, após seleção inicial por PU. Após repiques sucessivos em concentrações crescentes do antifúngico, 4 clones da amostra Ed01 (denominados Ed01f61, Ed01f62 Ed01f63 e Ed01f64) mantiveram crescimento em 6 µg/mL de fluconazol (três vezes o valor da CIM em caldo RPMI); 1 clone da amostra Tatu (denominado Tatuf71) cresceu em 7µg/mL (sete vezes o valor da CIM) de fluconazol um clone da mesma amostra (denominado Tatuf92) cresceu a 9 µg/mL do antifúngico (9 vezes o valor da CIM) (figura 8, tabela 31).

Com relação ao sulfametoxazol, repetiu-se a técnica de PU para as amostras selecionadas utilizando a concentração inicial de seleção para 400 e 500 µg/mL. Selecionaram-se 45 clones da amostra Pb4 em 400 µg/mL do antifúngico e 10 em 500 µg/mL; 39 clones da amostra Pb03 em 400 µg/mL e 12 em 500 µg/mL; 47 clones da amostra Pb18 cresceram na concentração de 400 µg/mL, não se observando qualquer crescimento na concentração de 500 µg/mL; 40 clones da amostra Tatu cresceram em 400 µg/mL de sulfametoxazol. Não houve crescimento da amostra Ed01 nas concentrações



Figura 8: Aspecto macromorfológico de clones de *P. brasiliensis* menos susceptíveis ao fluconazol. Colônias selecionadas inicialmente por PU foram diluídas em 10  $\mu$ L de solução salina 0,85% estéril e semeadas, por repiques sucessivos, em ágar YPD contendo concentrações crescentes de fluconazol. Incubou-se a 37°C por 15 dias. Em **A**: clones Ed01f61, Ed01f62 Ed01f63 e Ed01f64 da amostra Ed01 em 6  $\mu$ g/mL de fluconazol. Em **B**: clones Tatuf71 e Tatuf92 da amostra Tatu em 7 e 9  $\mu$ g/mL de fluconazol respectivamente.



Tabela 31: Subpopulações de amostras de *P. brasiliensis* menos susceptíveis a concentrações de fluconazol e sulfametoxazol incorporado ao Agar YPD, a 37°C

| <b>Fluconazol</b>     |                          |                                 |
|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|
| <b>Clones</b>         | <b>Amostra de origem</b> | <b>Concentração crescimento</b> |
| Ed01f61               | Ed01                     | 6 µg/mL                         |
| Ed01f62               | Ed01                     | 6 µg/mL                         |
| Ed01f63               | Ed01                     | 6 µg/mL                         |
| Ed01f64               | Ed01                     | 6 µg/mL                         |
| Tatuf71               | Tatu                     | 7 µg/mL                         |
| Tatuf92               | Tatu                     | 9 µg/mL                         |
| <b>Sulfametoxazol</b> |                          |                                 |
| <b>Clones</b>         | <b>Amostra de origem</b> | <b>Concentração crescimento</b> |
| Pb4s71                | Pb4                      | 700 µg/mL                       |
| Pb4s72                | Pb4                      | 700 µg/mL                       |
| Pb09s71               | Pb09                     | 700 µg/mL                       |
| Pb09s72               | Pb09                     | 700 µg/mL                       |
| Ts61                  | Tatu                     | 600 µg/mL                       |
| Ts62                  | Tatu                     | 600 µg/mL                       |
| Pb03s61               | Pb03                     | 600 µg/mL                       |
| Pb18s51               | Pb03                     | 500 µg/mL                       |
| Pb18s52               | Pb18                     | 500 µg/mL                       |
| Pb2s51                | Pb2                      | 500 µg/mL                       |

testadas (figura 9). Após repiques sucessivos em concentrações crescentes de sulfametoxazol (400, 500, 600, 700 e 800 µg/mL) e avaliação da estabilidade do fenótipo, verificou-se que 2 clones da amostra Pb4 (denominados Pb4s71 e Pb4s72) cresceram em 700 µg/mL de sulfametoxazol; 2 clones da amostra Tatu (denominados Ts61 e Ts62) e 1 clone da amostra Pb03 (denominado Pb03s61) cresceram em 600 µg/mL do antifúngico e 2 clones da amostra Pb18 (denominados Pb18s51 e Pb18s52) cresceram em 500 µg/mL do antifúngico (tabela 31, figura 10).

Testou-se ainda para sulfametoxazol a seleção pelo método DPM com todas as demais amostras de *P. brasiliensis*, utilizando como concentração inicial o valor da CIM em caldo RPMI, incluindo-se a amostra Ed01. Obtiveram-se inicialmente, 30 colônias da amostra 1578; 3 colônias da amostra Pb2; 4 colônias da amostra Pb6; 6 colônias da amostra Pb5; 19 colônias da amostra Pb11; 13 colônias da amostra Pb13; 22 colônias da amostra Pb10; 6 colônias da amostra Pb14; 14 colônias da amostra Pb09; 14 colônias da amostra Pb9 e 5 colônia Pb8; não havendo novamente seleção de colônias da amostra Ed01. Após repiques sucessivos em concentrações crescentes de sulfametoxazol (400, 500, 600, 700 e 800 µg/mL) e avaliação da estabilidade do fenótipo, verificou-se que 2 clones da amostra Pb09 (denominados Pb09s71 e Pb09s72) cresceram em 700 µg/mL de sulfametoxazol e que 1 clone da amostra Pb2 (denominada Pb2s51) cresce em 500 µg/mL do antifúngico (tabela 31, figura 10).

No entanto, quando se realizou novamente da determinação de CIM em caldo RPMI dos antifúngicos anfotericina B, itraconazol, cetoconazol, fluconazol, sulfametoxazol, bactrim e terbinafina frente às subpopulações de *P. brasiliensis* selecionadas em sulfametoxazol, registrou-se algumas divergências nos valores da CIM com relação às suas amostras parentais. Observou-se que o clone Pb09s71 apresentou uma redução no valor da CIM de 16 vezes (0,0039 µg/mL) em comparação com a amostra parental Pb09 (0,062 µg/mL) para itraconazol além de uma redução na concentração de tolerância a sulfametoxazol de 700 µg/mL, conseguida no processo de seleção em ágar YPD, para 500 µg/mL em caldo RPMI. Situação semelhante ocorreu com a

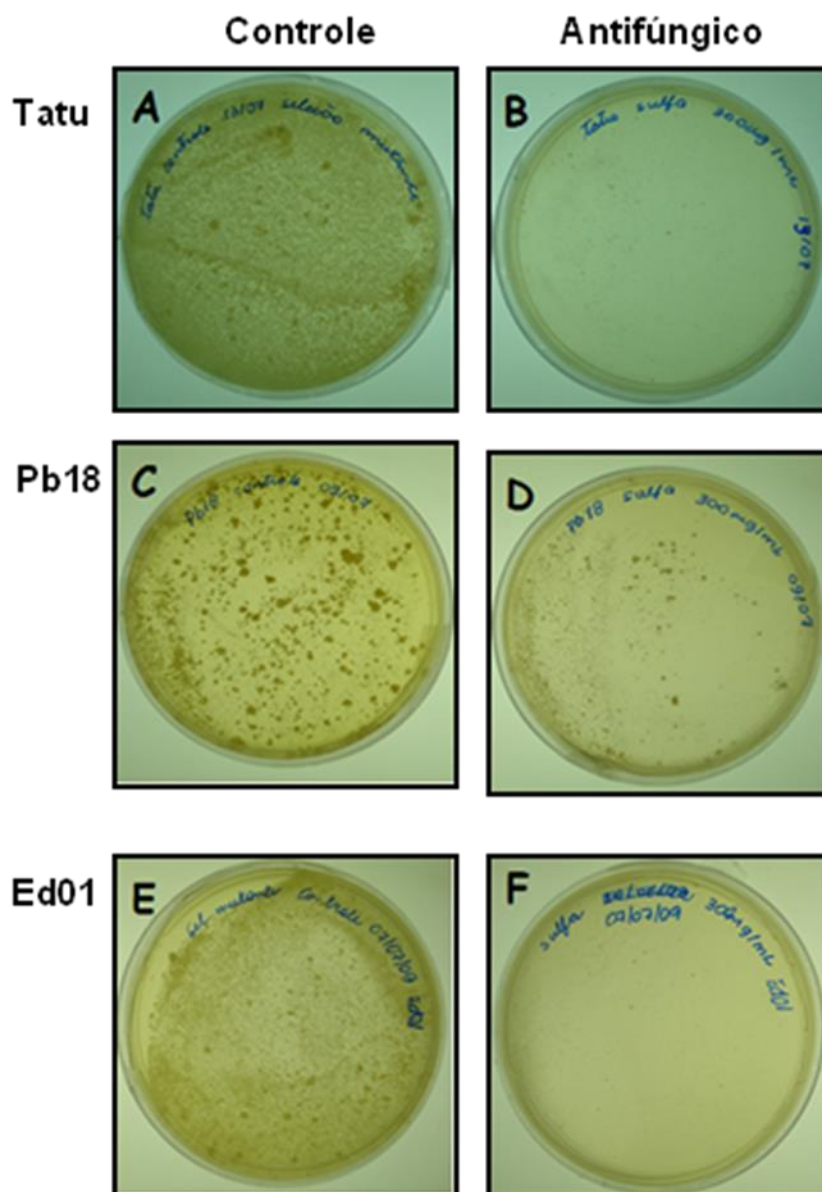


Figura 9: Seleção de subpopulações de *P. brasiliensis* por meio da técnica de PU em sulfametoxazol. Semeou-se um volume de 1 mL do inóculo padronizado das amostras de *P. brasiliensis* em ágar YPD com ou sem 400 µg/mL de sulfametoxazol e incubou-se a 37°C por 20-30 dias. Em **A**, **C** e **E**: crescimento de colônias das amostras Tatu, Pb18 e Ed01 respectivamente em ágar YPD (controle positivo). Em **B** e **D**: crescimento de colônias das amostras Tatu e Pb18 em ágar YPD com 400 µg/mL de sulfametoxazol. Em **F**: ausência de crescimento da amostra Ed01 ágar YPD com 400 µg/mL de sulfametoxazol.

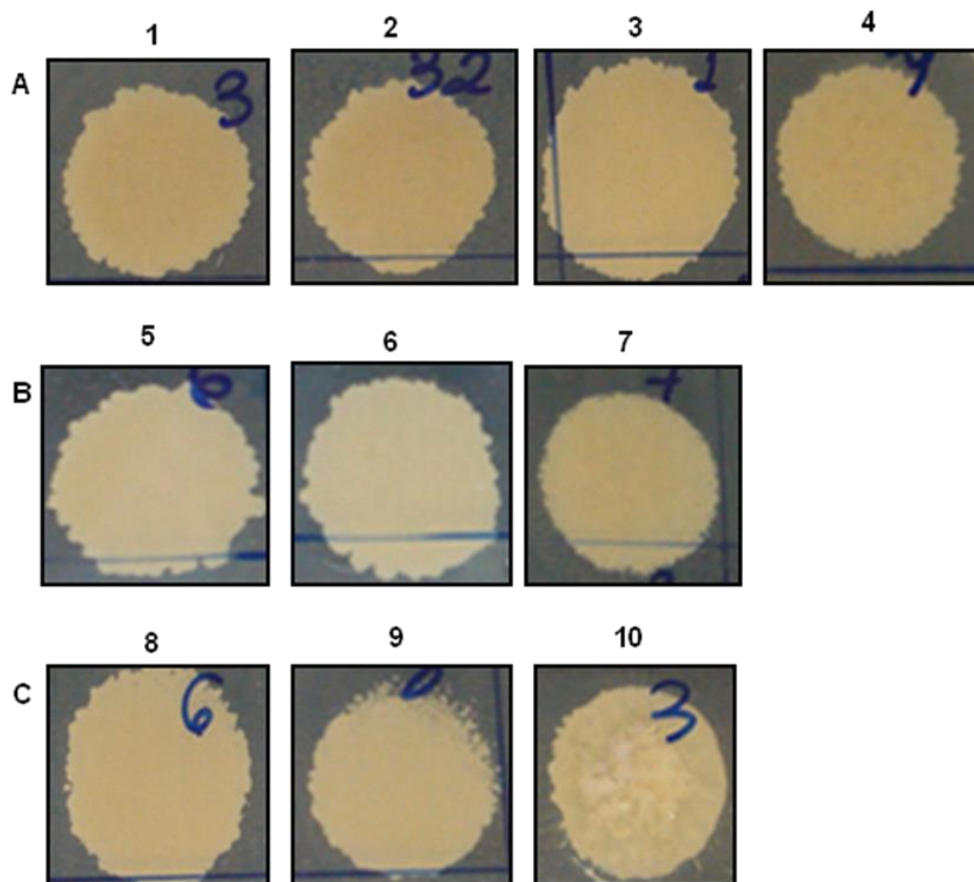


Figura 10: Aspecto macromorfológico de clones *P. brasiliensis* selecionados em concentrações crescentes de sulfametoxazol. Colônias selecionadas inicialmente por PU foram diluídas em 10  $\mu$ L de solução salina 0,85% estéril e semeadas, por repiques sucessivos, em ágar YPD contendo concentrações crescentes de sulfametoxazol. Incubou-se a 37°C por 15 dias. Em **A**: Crescimento em 700  $\mu$ g/mL de sulfametoxazol; **B**: crescimento em 600  $\mu$ g/mL de sulfametoxazol; **C**: crescimento em 500  $\mu$ g/mL do antifúngico. Números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10: clones Pb4s71, Pb4s72, Pb09s71, Pb09s72, Ts61, Ts62, Pb03s61, Pb18s51, Pb18s52 e Pb2s1, respectivamente.

amostra Ts61: registrou-se uma redução de 8 vezes no valor da CIM para cetoconazol (0,0019 µg/mL) em relação a amostra parental tatu (0,015µg/mL) e uma redução de 4 vezes no valor em comparação com a parental (300 µg/mL).

Este clone também apresentou uma redução na concentração de tolerância a sulfametoxazol de 600µg/mL, conseguida no processo de seleção em ágar YPD, para 500 µg/mL em caldo RPMI. Os clones Pb4s71 e Pb18s51 mantiveram a mesma concentração de tolerância a sulfametoxazol obtida no processo de seleção (700 e 500 µg/mL respectivamente). Para os demais antifúngicos, os valores de CIM não se alteraram de forma significativa (tabela 32).

Registrou-se também ao final do ensaio de determinação de CIM, que a morfologia leveduriforme a 37°C foi restaurada nos clones Pb4s71, Pb09s71 e Pb18s51 independente da presença de antifúngicos (figura 11). Vale ressaltar que a morfologia da amostra parental de todos esses clones tornava-se filamentosa após o cultivo em caldo RPMI a 37°C. Não houve alteração na morfologia do clone Ts61, que, como a sua amostra parental Tatu, permaneceu leveduriforme durante o ensaio de CIM em RPMI a 37°C.

#### 5.9.4 Seleção de subpopulações de *P. brasiliensis* atípicas para o dimorfismo térmico

Devido a uma dificuldade inicial na obtenção de clones de *P. brasiliensis* tolerantes a concentrações crescentes de antifúngicos a 37°C por PU, com base na hipótese de que além do estresse seletivo da droga, a temperatura poderia atuar como um acréscimo de estresse durante o processo. Optou-se por testar alíquotas retiradas diretamente do ensaio de CIM para sulfametoxazol, incubando-se a 37°C e também à temperatura ambiente. Testou-se no primeiro momento a amostra B339 que não apresentou crescimento a 37°C em 300 µg/mL de sulfametoxazol. No entanto, após 60 dias de incubação em temperatura ambiente, observou-se o crescimento de colônias em 300 µg/mL de sulfametoxazol (valor da CIM) que exibiram

Tabela 32: Comparação dos valores de CIM de antifúngicos para amostras de *P. brasiliensis* parentais e subpopulações selecionadas em sulfametoxazol, determinados em caldo RPMI, a 37°C, 15 dias de incubação

| Antifúngicos   | Amostras em caldo RPMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) |        |        |         |        |        |        |         |
|----------------|---|--------|--------|---------|--------|--------|--------|---------|
|                | Pb4   | Pb4s71 | Pb09   | Pb09s71 | Tatu   | Ts61   | Pb18   | Pb18s51 |
| Anfotericina B | 1,0   | 0,5    | 1,0    | 0,5     | 1,0    | 0,5    | 1,0    | 1,0     |
| Itraconazol    | 0,062                                       | 0,062  | 0,062  | 0,0039  | 0,0078 | 0,0078 | 0,0039 | 0,0078  |
| Cetoconazol    | 0,031                                       | 0,031  | 0,0039 | 0,0019  | 0,015  | 0,0019 | 0,0019 | 0,0019  |
| Fluconazol     | 8,0   | 4,0    | 1,0    | 0,5     | 1,0    | 0,25   | 0,25   | 0,5     |
| Sulfametoxazol | 300   | 700    | 300    | 500     | 300    | 500    | 300    | 500     |
| Bactrim        | 300   | 300    | 300    | 300     | 300    | 75     | 150    | 300     |
| Terbinafina    | 0,5   | 1,0    | 0,5    | 1,0     | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,5     |

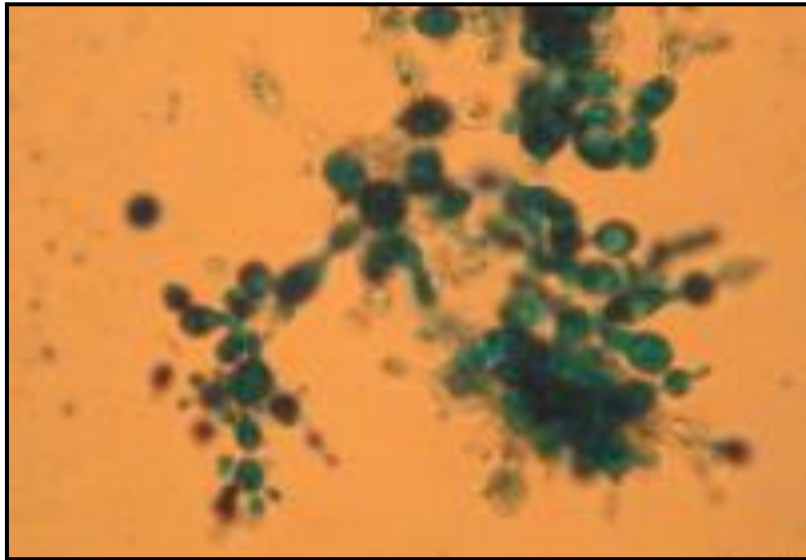


Figura 11: Morfologia leveduriforme do clone Pb09s71. Morfologia característica de *P. brasiliensis* em cultivo a 37°C observada no clone Pb09s71 da amostra parental Pb09 após o final do ensaio de determinação da CIM em caldo RPMI a 37°C. Lâmina preparada com 10  $\mu$ L da suspensão de células e 1  $\mu$ L de lactofenol, observadas por microscopia óptica em aumento de 40x.

morfologia atípica para cultivos realizados a temperatura ambiente, apresentando textura cerebriforme. A análise microscópica revelou morfologia leveduriforme (figura 12).

Semearam-se 10 dessas colônias, escolhidos ao acaso, em ágar YPD na ausência e na presença de 300 µg/mL de sulfametoxazol, incubando-se à temperatura ambiente. A morfologia filamentosa foi restaurada na ausência do antifúngico para os 10 clones e para 7 dos 10 cultivados na presença do antifúngico. Semearam-se novamente os 3 clones com morfologia macroscópica sugestiva de crescimento leveduriforme, em ágar YPD na presença e ausência do antimicrobiano. Após 4 repiques nestas condições, os clones exibiram morfologia leveduriforme em ágar YPD independente da presença de sulfametoxazol (figura 13). Após repiques sucessivos em concentrações crescentes de sulfametoxazol e análise da estabilidade do fenótipo, observou-se crescimento até 400 µg/mL do antifúngico e morfologia leveduriforme na temperatura ambiente independente da presença do antifúngico (figura 14). Os clones selecionados mantiveram também morfologia leveduriforme estável em cultivos a 37°C.

Confirmou-se a identidade molecular de *P. brasiliensis* (figura 15) por meio de “nested PCR” baseada na amplificação específica de regiões do gene que codifica a gp43, inicialmente um fragmento de 355 pb seguindo-se a amplificação de um fragmento interno de 196pb. Os 3 clones da amostra B339 foram denominados: BCL1, BCL2 e BCL4.

Estes resultados levaram à realização do mesmo procedimento para cada uma das demais amostras selecionadas, cultivando-se em ambas as temperaturas. Destas, 19 exibiram morfologia filamentosa a temperatura ambiente e uma amostra (Pb13) apresentou crescimento de colônias exibindo morfologia macroscópica sugestiva de levedura. Selecionou-se ao acaso 10 clones de Pb13 e semeou-se em ágar YPD na ausência e na presença de sulfametoxazol. A morfologia filamentosa foi restaurada no cultivo na ausência do antifúngico para os 10 clones e para 8 daqueles cultivados na presença do antifúngico. Semearam-se novamente os 2 clones da amostra Pb13 em ágar YPD na ausência e na presença de sulfametoxazol (300 e 400 µg/mL). Após 6 repiques sucessivos nestas condições, os clones mostraram-se inviáveis.



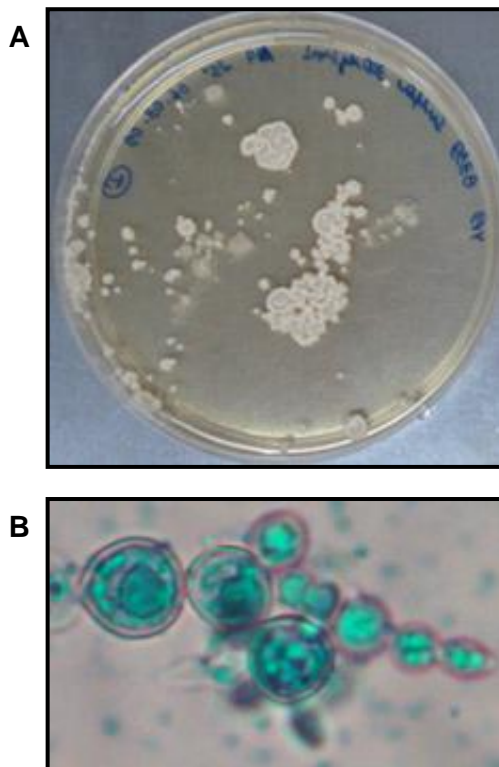


Figura 12: Morfologia atípica em temperatura ambiente de um clone de *P. brasiliensis* derivado da amostra B339. Em **A**: Morfologia de colônia cerebriforme sugestiva de crescimento leveduriforme de clones selecionados a partir da amostra B339 em ágar YPD contendo 300  $\mu\text{g/mL}$  de sulfametoxazol, em TA, durante 60 dias. Em **B**: Morfologia microscópica leveduriforme de alíquota representativa. Lâmina preparada com 10  $\mu\text{L}$  da suspensão de células e 1  $\mu\text{L}$  de lactofenol, observadas por microscopia óptica em aumento de 40x.

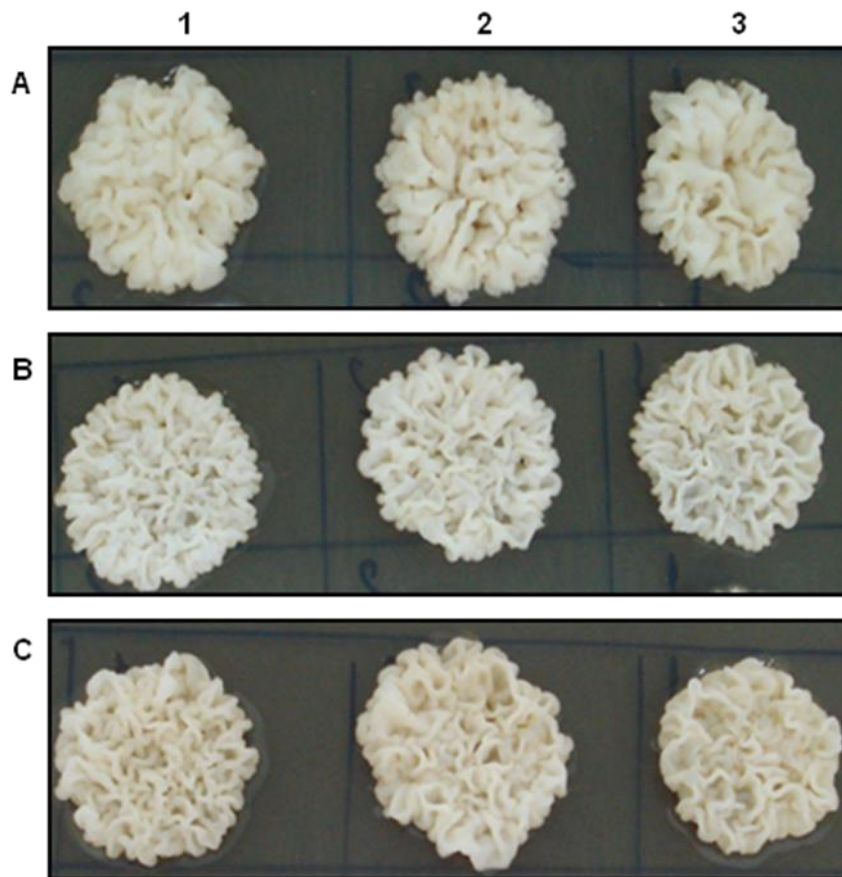


Figura 13: Morfologia colonial cerebriforme de clones da amostra B339 em temperatura ambiente. Os clones da amostra B339 foram diluídos em 10 µL de solução salina 0,85% estéril e semeados em ágar YPD na presença e na ausência de sulfametoxazol. Incubaram-se em temperatura ambiente por 20 dias. Em **A**: Cultivo dos clones em ágar YPD sem antifúngico. Em **B**: Cultivo em ágar YPD contendo 300 µg/mL de sulfametoxazol. Em **C**: cultivo em ágar YPD com 400 µg/mL de sulfametoxazol. Números 1, 2 e 3: clones BCL1, BCL2 e BCL4 respectivamente.

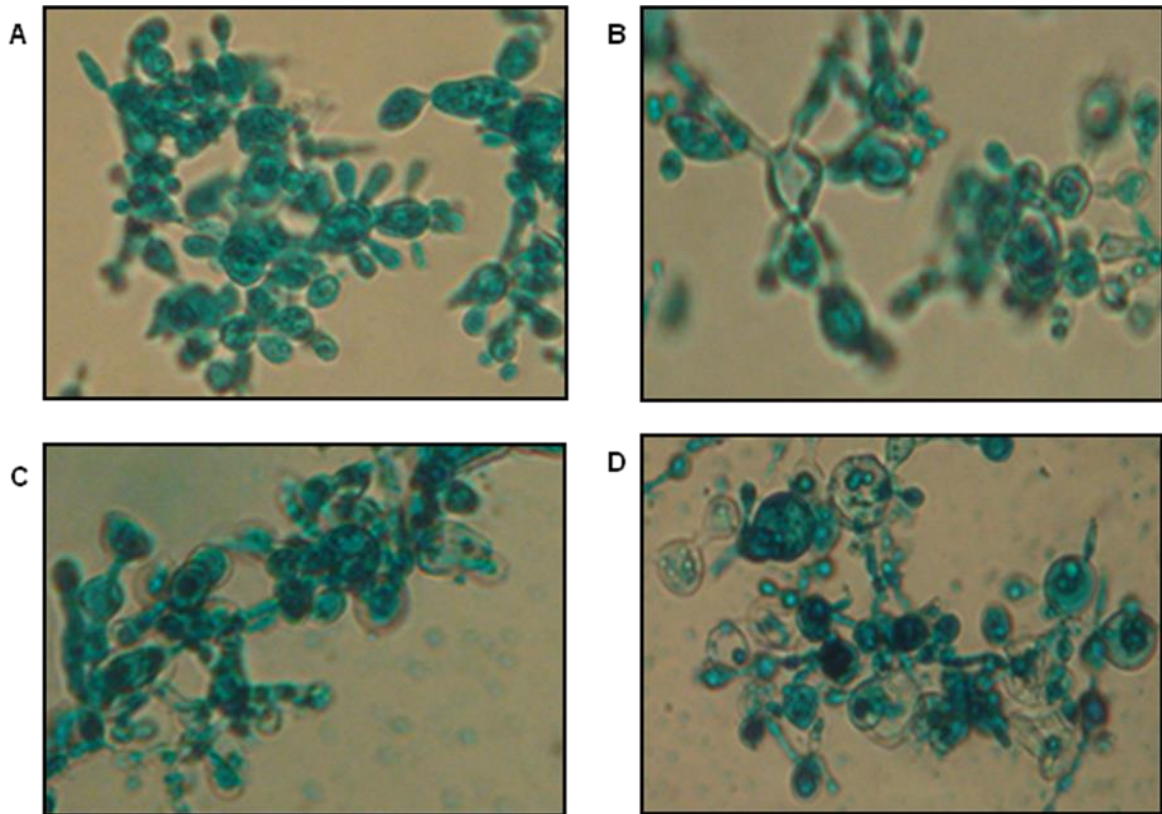


Figura 14: Comparação da morfologia microscópica da amostra parental B339 com o clone BCL4 em diferentes condições de cultivo. Em **A**: amostra parental B339 com micromorfologia leveduriforme cultivada em YPD a 37°C por 7 dias. Em **B**, **C** e **D**: clone BCL4 cultivado em ágar YPD; YPD com 300 e 400 µg/mL de sulfametoxazol respectivamente, com micromorfologia leveduriforme, em TA por 15 dias. Lâminas preparadas com 10µL da suspensão de células e 1 µL de lactofenol, observadas por microscopia óptica em aumento de 40x.

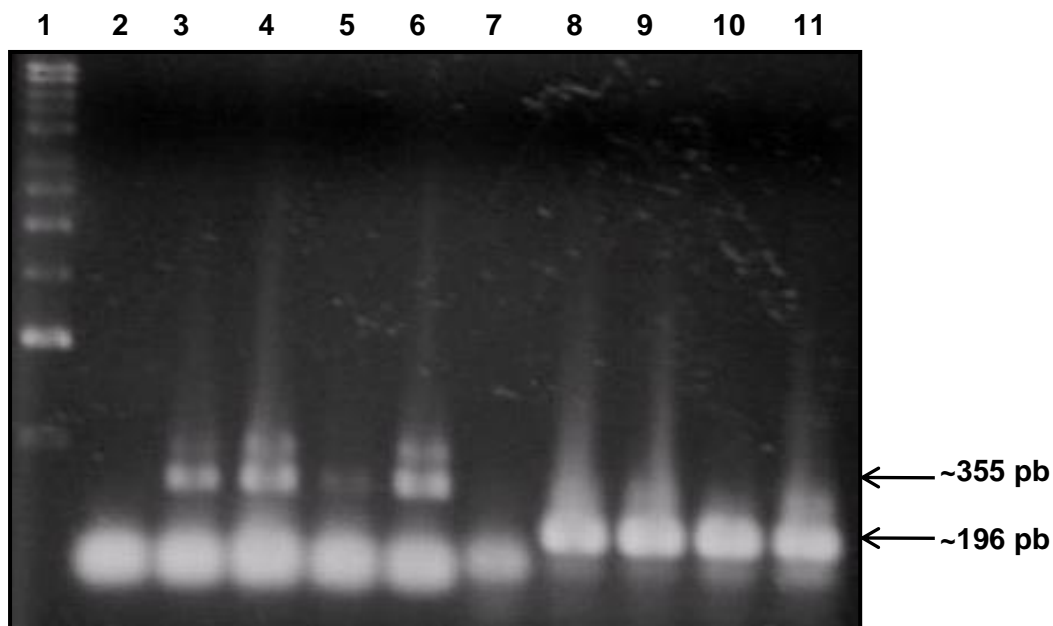


Figura 15: Confirmação da identidade molecular do clone BCL4 por Nested PCR. Alíquotas de DNA extraídos das amostras parental B339 e do clone BCL4 cultivadas em diferentes condições experimentais foram utilizadas para amplificação empregando os iniciadores descritos por Bialek e colaboradores (BIALEK et al., 2000) e os produtos resolvidos por eletroforese em gel de agarose 1%. Em 1: padrão molecular DNA Ladder 1Kb; em 2 e 7: amplificação sem DNA molde (branco); canaletas 3-11: amplicons de ~355 pb obtidos na primeira reação de PCR (externa, 3-6) e amplicons de ~196 pb obtidos pela segunda PCR (interna, 8-11) da amostra B399 cultivada em ágar YPD a 37°C (3 e 8) e da amostra BCL4 cultivada em ágar YPD em TA (4 e 9), YPD acrescido de 400 µg/mL de sulfametoxazol em temperatura ambiente (5 e 10) e em ágar YPD a 37°C (6 e 11) respectivamente.

Testou-se também o cultivo em temperatura ambiente dos clones das amostras Tatu e Ed01 obtidos por seleção em fluconazol a 37°C.

Os clones da amostra Ed01 mantiveram morfologia filamentosa em TA independente da presença de fluconazol. Após repiques sucessivos na presença do antifúngico, 3 dos 4 clones da amostra Tatu mantiveram crescimento em 8 µg/mL de fluconazol (8 vezes o valor da CIM). Observou-se, nesses clones, morfologia macroscópica cerebriforme, sugestiva de levedura, quando cultivados em TA na presença de concentrações a partir de 7 µg/mL do antifúngico. No entanto, a análise microscópica revelou morfologia filamentosa. A textura macroscópica aveludada, característica da fase filamentosa foi restaurada em 1 dos clones quando em cultivo na ausência de fluconazol (figura 16). Será dada continuidade aos repiques sucessivos em 8 µg/mL e desafio em 9 µg/mL do antifúngico, acompanhando-se o aspecto morfológico macroscópico e microscópico dos cultivos.

#### **5.10 Análise preliminar da expressão diferencial de proteínas do clone BCL1 por 2-DE**

Realizaram-se experimentos piloto para análise proteômica do clone BCL1 (B33925L) de *P. brasiliensis*. Para isso, utilizou-se eletroforese bidimensional a partir de extrato total de proteínas do clone BCL1 (B33925L), cultivados em TA em meio YPD, acrescido ou não de sulfametoxazol na concentração de 400 µg/mL. Uma análise visual preliminar demonstrou a indução e/ou inibição da expressão de numerosas proteínas potencialmente relacionadas ao processo de adaptação frente ao antifúngico, isto é, proteínas relacionadas à sobrevivência na condição testada (figura 17). Serão realizados novos experimentos para determinação das proteínas diferencialmente expressas durante as condições de interesse que incluirá análise do clone BCL1 e da amostra parental B339 cultivada em YPD a 37°C e em TA. Prevê-se realizar também a análise dos demais clones das amostras de *P. brasiliensis* menos sensíveis a sulfametoxazol e fluconazol objetivando observar potenciais alterações nos níveis de proteínas na presença de antifúngicos e/ou

perfil de proteínas em TA de clones que apresentaram variação morfológica nessa condição.

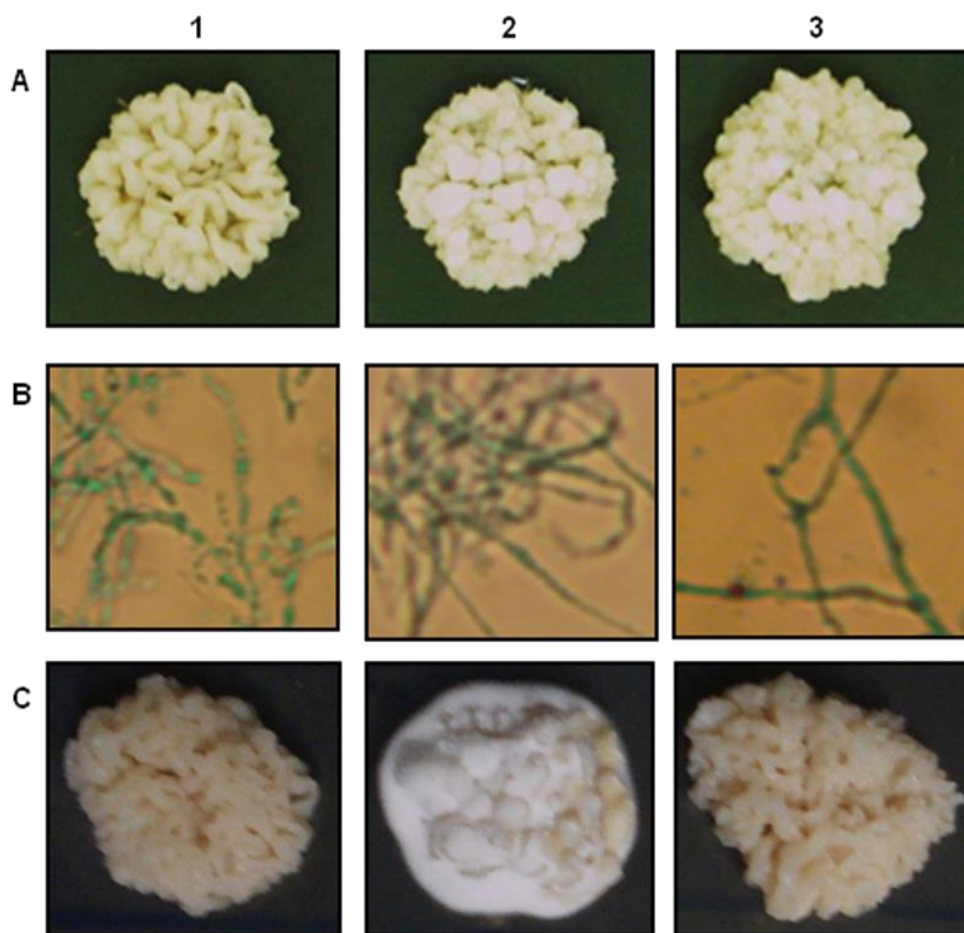


Figura 16: Acompanhamento morfológico de clones da amostra Tatu em temperatura ambiente. Três clones da amostra Tatu previamente selecionados a 37°C foram diluídos em 10  $\mu$ L de solução salina 0,85% estéril e semeados em ágar YPD na presença e na ausência de fluconazol. Em A: textura cerebriforme de colônias sugestiva de crescimento leveduriforme para os clones 1, 2 e 3 em ágar YPD com 7  $\mu$ g/ml de fluconazol; B: micromorfologia filamentosa dos clones 1, 2 e 3 em ágar YPD com 7  $\mu$ g/ml de fluconazol. Lâminas preparadas com 10 $\mu$ L da suspensão de células e 1  $\mu$ L de lactofenol, observadas por microscopia óptica em aumento de 40x. Em C: Restauração da textura aveludada de colônia filamentosa do clone 2 e manutenção da textura cerebriforme sugestiva de crescimento leveduriforme para os clones 1 e 3 em ágar YPD.



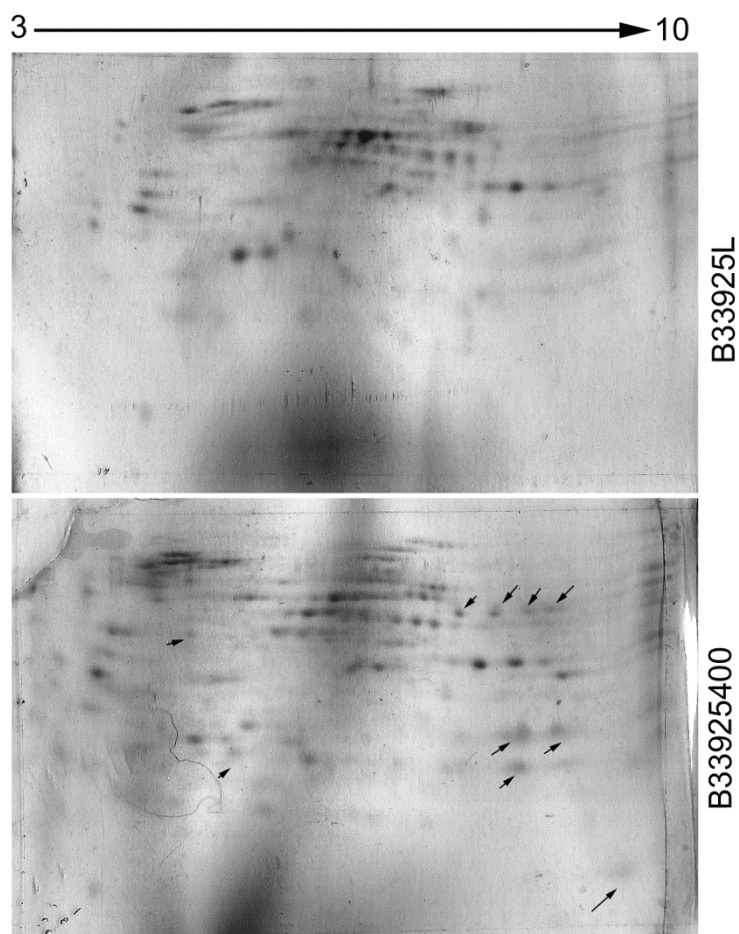


Figura 17: Análise da expressão diferencial de proteínas por 2-DE. Perfil de proteínas expressas na amostra BCL1 (B33925L), cultivada em meio YPD e temperatura ambiente por 15 dias e BCL1 (B33925400), cultivada em meio YPD contendo 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de sulfametoxazol em TA; resolvidas em eletroforese bidimensional (tiras pH 3 - 10NL). As setas indicam proteínas cuja expressão foi induzida e/ou inibidas durante a exposição a 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do antifúngico.



## 6. Discussão

Para selecionar subpopulações de *P. brasiliensis* menos sensíveis ou resistentes a antifúngicos foi necessário, inicialmente, determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de antifúngicos para diferentes amostras do fungo. Esta etapa permitiria estabelecer as concentrações iniciais das drogas antifúngicas e a escolha das amostras do fungo a serem submetidas ao processo seletivo. Para essa caracterização adotou-se um protocolo padronizado pelo CLSI (CLSI M27-A2) percebendo-se, a partir do emprego de múltiplas amostras, que seria necessário proceder a adequações para otimizar sua aplicação em *P. brasiliensis*.

Entre os parâmetros redefinidos no presente trabalho citam-se a concentração inicial do inóculo, o período de incubação, as temperaturas de incubação e os meios de cultura empregados, sendo estes últimos os aspectos que mais influenciaram a expansão da investigação relativa às melhores condições experimentais. Expansão decorrente, principalmente, da observação de que, em cerca de 80% das amostras testadas, a morfologia leveduriforme característica de cultivos a 37°C se alterava convertendo-se para formas miceliais, mesmo nesta temperatura, ao empregar-se o meio de cultura padrão, ou seja, o meio RPMI 1640.

Em função dessa variação morfológica, os valores de CIM obtidos por meio da técnica de microdiluição em placa, em caldo RPMI a 37°C, poderiam ser questionáveis, considerando-se que, na enorme maioria dos casos clínicos, a forma de levedura de *P. brasiliensis* é a forma parasitária tecidual, contra a qual se dirige a aplicação terapêutica de antifúngicos nos casos da doença. As excepcionalidades descrevem o raro achado de formas hifais do fungo em tecidos humanos, associadas a relatos clínicos da ocorrência concomitante de PCM com doenças de base e debilitantes, como lesões cancerígenas de pulmão (LONDERO et al., 1980).

Portanto, fizeram-se modificações no protocolo relativas ao meio de cultura empregado. Num primeiro momento, alterou-se a composição do meio RPMI 1640, como previamente relatado para *S. schenkii*, suplementando-se com glicose para uma concentração final de 2% (KOHLENER, 2008) e, sucessivamente, buscaram-se outros meios de cultura que permitissem a estabilidade da morfologia leveduriforme durante os experimentos de determinação de CIM. Essas modificações geraram resultados substanciais e

para sua abordagem sistemática esse capítulo será subdividido em dois tópicos de discussão: 1 - determinação de CIM de antifúngicos frente a *P. brasiliensis* por microdiluição em placa; 2 - seleção de subpopulações de *P. brasiliensis* menos sensíveis ou resistentes a antifúngicos.

#### 6.1 Determinação de CIM de antifúngicos frente a *P. brasiliensis* por microdiluição em placas

O protocolo padrão disponível para testes de susceptibilidade a antifúngicos é o CLSI M 27-A2 adotado para algumas espécies de leveduras. A metodologia descrita nesse protocolo foi modificada resultando no protocolo padronizado CLSI M38-A, proposto para uso em testes de susceptibilidade para fungos filamentosos e para o fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*. Inexiste um protocolo padrão do CLSI de testes de susceptibilidade aos antifúngicos aplicável para outros fungos dimórficos. Por outro lado, há registros de testes com *P. brasiliensis* e outros dimórficos conduzidos empregando-se protocolos de diluição em Agar e protocolos de macro e microdiluição em caldo. Esses registros são geralmente adequações do protocolo do CLSI M27-A2 ou do protocolo descrito por Shadomy e colaboradores (SHADOMY et al., 1987). Essas adequações incluem diferenças na preparação e tamanho de inóculos, meios de cultura utilizados no ensaio, períodos de incubação e temperaturas testados (RESTREPO & ARANGO, 1980; HAMDAN & REZENDE, 1988; HAHN & HAMDAN, 2000 (a); HAHN & HAMDAN, 2000 (b); ESPINEL-INGROFF et al., 2002; HAHN et al., 2002; HAHN et al., 2003; NAKAI et al., 2003; da SILVA et al., 2006; CAMPOS, et al., 2009; JOHANN et al., 2010 (a); JOHANN et al., 2010 (b); LIMA et al., 2010). A ausência de protocolos padronizados implica diretamente nos valores de CIM encontrados na literatura, pois diferentes pesquisadores adotam diferentes metodologias para execução de testes de susceptibilidade.

Neste trabalho, seguiram-se as recomendações propostas no CLSI M27-A2, com algumas modificações, para testar as concentrações de antifúngicos efetivas *in vitro* para *P. brasiliensis*. Primeiramente, realizaram-se ensaios prévios com três valores de concentrações de inóculo ( $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  céls/mL)

em caldo RPMI, com 13 amostras do fungo. A concentração inicial de  $10^3$  céls/mL é sugerida pelo CLSI M27-A2 e a concentração de  $10^5$  céls/mL foi adotada em alguns trabalhos envolvendo ensaios de determinação de CIM em *P. brasiliensis* (HAMDAN & REZENDE, 1988; HAHN & HAMDAN, 2000; HAHN & HAMDAN, 2000; JOHANN et al., 2010 (a) ; JOHANN et al., 2010 (b); LIMA et al., 2010). Os resultados indicam que um melhor crescimento e leitura de CIM foram conseguidos quando se utilizou a concentração inicial de  $10^5$  céls/mL. Este resultado mostra-se coerente com outros observados na literatura que empregaram concentrações iniciais de  $10^4$  ou  $10^5$  céls/mL (HAMDAN & REZENDE, 1988; HAHN & HAMDAN, 2000 (a); HAHN & HAMDAN, 2000 (b); HAHN et al., 2002; JOHANN et al., 2010 (a); LIMA et al., 2010).

Diferentes autores também propuseram tempos de incubação distintos nos testes de susceptibilidade a antifúngicos *in vitro* para *P. brasiliensis*, com faixas que podem variar de 72 horas até 8 dias (HAMDAN & REZENDE, 1988; HAHN & HAMDAN, 2000; HAHN & HAMDAN, 2000; HAHN et al., 2002; JOHANN et al., 2010 (a). Uma proposição interessante feita por NAKAI e colaboradores (NAKAI et al., 2003) foi a de se iniciarem as leituras de CIM somente após o crescimento satisfatório das amostras controle nas placas de microtitulação, independentemente do tempo de incubação.

Os resultados do presente estudo mostraram que o tempo de incubação influenciou diretamente os valores de CIM para a maioria das condições testadas e para todas as amostras analisadas ( $P < 0,05$ ). Contudo, quando se analisa a influência do período de incubação por meio do método estatístico de Wilcoxon (análise pareada de variáveis não paramétricas), algumas considerações podem ser ressaltadas. Em relação à anfotericina B, a  $37^\circ\text{C}$ , em caldo meio RPMI, os resultados mostraram que não ocorreu diferença estatística nos valores de CIM registrados entre o período de 7 e 10 dias e entre 10 e 15 dias de leitura (ANEXO D, tabela 14). Nesta condição, considerando-se a estabilidade de valores de CIM para a leitura dos resultados da anfotericina B, o tempo de incubação poderia ser reduzido para 10 dias. Contudo, as diferenças nos valores da CIM<sub>90</sub> registrados nos ensaios com leituras após 15 dias em diferentes meios de cultura ficam aparentes, correspondendo a  $1,0 \mu\text{g/mL}$  no meio RPMI, a  $0,25 \mu\text{g/mL}$  no meio MHM e a  $2,0 \mu\text{g/mL}$  no meio MVM. Para o antifúngico itraconazol, a  $37^\circ\text{C}$ , não se

registrou variação significativa nos valores de CIM registrados entre 7, 10 e 15 dias de incubação nos meios RPMI ou MHM e entre 10 e 15 dias no meio MVM (ANEXO D, tabela 15). Em temperatura ambiente, para o itraconazol, não houve diferença no intervalo de 10 e 15 dias de incubação no meio RPMI ( $P > 0,05$ ). Também para esse antifúngico, o tempo de incubação poderia ser reduzido para 7 dias caso se utilizassem os meios RPMI ou MHM, a 37°C, e para 10 dias caso se usasse o meio MVM, em temperatura ambiente. Nestas condições, a 37°C, registraram-se valores de CIM<sub>90</sub> que difeririam amplamente conforme o meio de cultura, correspondendo a 0,0039 µg/mL no meio MHM, de 0,031 µg/mL no caldo RPMI e de 0,25 µg/mL no MVM.

Para cetoconazol, a 37°C, nos meios RPMI e MHM não se observou variação significativa nos valores de CIM entre 7, 10 e 15 dias de incubação e em temperatura ambiente entre 10 e 15 dias (ANEXO D, tabela 16). Se esses meios fossem utilizados num ensaio, a 37°C, seria possível uma redução do tempo de incubação para 7 dias, condição na qual seriam esperados valores de CIM<sub>90</sub> correspondentes a 0,015 e 0,0019 µg/mL, respectivamente. Se em temperatura ambiente, o tempo de leitura poderia ser reduzido para 10 dias, com expectativa de CIM<sub>90</sub> = 0,25 e 0,0019 µg/mL, respectivamente.

Com relação ao fluconazol, não houve variações significativas nos valores de CIM registrados entre os tempos de 10 e 15 dias de incubação no meio MHM, entre 7, 10 e 15 dias no meio MVM a 37°C; e entre 10 e 15 dias em temperatura ambiente para os meios RPMI e MHM (ANEXO D, tabela 17). Quando da realização de ensaios empregando esses meios, a 37°C, o tempo de incubação para o fluconazol poderia ser reduzido para 7 ou 10 dias em MVM ou MHM. Quando em temperatura ambiente, para essa droga, o ensaio poderia ser encerrado aos 10 dias nos meios RPMI e MHM. Nestas condições e intervalos de leitura, poderiam ser observadas CIM<sub>90</sub> correspondentes, respectivamente, a 1,0 e 2,0 µg/mL (37°C) e de 4,0 e 2,0 µg/mL (temperatura ambiente).

Para sulfametoxazol, a 37°C, não se registraram variações significativas nos valores de CIM entre 7, 10 e 15 dias nos meios MHM e MVM. Em temperatura ambiente, não se registraram variações significativas nos valores de CIM entre 10 e 15 dias de incubação nos meios RPMI e MHM (ANEXO D, tabela 18). O tempo de incubação poderia ser reduzido para 7 dias a 37°C para

MHM e MVM, intervalo no qual registraram-se os valores de CIM<sub>90</sub> = 150 µg/mL e 18,75 µg/mL, respectivamente. Na temperatura ambiente, com leituras de 10 dias, tanto em RPMI quanto em MHM, com valores registrados para a CIM<sub>90</sub>= 300 µg/mL/ mL. Com relação ao bactrim, não ocorreu diferença nos valores de CIM entre 7, 10 e 15 dias para MHM a 37°C e 10 e 15 dias para RPMI e MHM em temperatura ambiente (ANEXO D, tabela 19). Poder-se-ia então, diminuir o tempo de incubação para 7 dias a 37°C no meio MHM condição em que se encontrou CIM<sub>90</sub> = 150µg/ mL, e para 10 dias em temperatura ambiente nos meios RPMI e MHM, com CIM<sub>90</sub>= 300 µg/ mL.

Para terbinafina, não se registrou variação significativa nas leituras realizadas entre 10 e 15 dias de incubação a 37°C e em temperatura ambiente quando o meio MHM foi testado (ANEXO D, tabela 20), podendo o intervalo de leitura ser reduzido para 10 dias. Neste caso, meio e temperaturas, registraram-se valores de CIM<sub>90</sub> = 0,125 e 0,25 µg/mL, respectivamente.

Em síntese, nos intervalos de tempo analisados observou-se uma maior variabilidade nos valores de CIM registrados no meio RPMI e uma menor variabilidade no meio MHM. Os resultados mostraram que um período de 7 dias de incubação não era suficiente para promover o crescimento satisfatório de todas as amostras de *P. brasiliensis* usadas neste estudo o que poderia indicar uma leitura imprecisa de CIM. Após 10 dias de incubação, o crescimento foi ainda insuficiente para isolados mais fastidiosos. Por outro lado, um crescimento mais expressivo de todas as amostras testadas ocorreu após 15 dias de incubação, e mesmo na ausência de variações nos valores de CIM para algumas drogas nos intervalos de 7 e 10 ou entre 10 e 15 dias de incubação, as análises estatísticas indicam ser o período de 15 dias o mais indicado para a leitura de CIM. Este resultado mostra-se em desacordo com os encontrados na literatura que sugerem menores períodos de incubação para a determinação de CIM.

A temperatura ideal de incubação para a determinação de CIM de fungos dimórficos pode ser também questionada. Vários autores utilizam somente uma pequena faixa de 35 a 37°C para os ensaios de CIM (RESTREPO & ARANGO, 1980; HAMDAN & REZENDE, 1988; HAHN & HAMDAN, 2000 (a); HAHN & HAMDAN, 2000 (b); ESPINEL-INGROFF et al., 2002; HAHN et al., 2002; HAHN et al., 2003; da SILVA et al., 2006; CAMPOS,

et al., 2009; JOHANN et al., 2010 (a); JOHANN et al. (b), 2010; LIMA et al., 2010), certamente porque nesta faixa, que corresponde à temperatura corporal humana, é possível encontrar a forma parasitária do fungo dimórfico quando a terapia antifúngica se torna necessária. Contudo, é interessante se conhecer a influência da variação de temperatura nos valores de CIM de antifúngicos para fungos dimórficos inclusive porque a comparação poderia gerar informações potencialmente relevantes para estudos ambientais.

Os resultados mostraram que a temperatura de incubação influenciou diretamente os valores de CIM ( $P < 0,05$ ), e que, em geral, valores mais altos de CIM foram obtidos em temperatura ambiente em comparação com aqueles obtidos a 37°C. Poucos estudos apresentam valores de CIM de antifúngicos para *P. brasiliensis* em ambas as temperaturas. Nakai e colaboradores (NAKAI et al., 2003), empregando o meio RPMI na técnica de microdiluição em placa, encontraram valores de CIM mais altos em temperatura ambiente para fluconazol, valores mais altos a 37°C para anfotericina B e valores similares em ambas as temperaturas para itraconazol. Os resultados do presente trabalho também mostraram maiores valores de CIM a 37°C para anfotericina B e valores similares para itraconazol e fluconazol em ambas as temperaturas quando o meio RPMI foi empregado.

Para todos os meios testados (RPMI, MVM e MHM) observaram-se valores de CIM estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Obtiveram-se valores mais altos de CIM em RPMI em comparação com os outros meios testados. O meio proposto pelo CLSI permitiu o crescimento satisfatório para todos os isolados, confirmando relatos anteriores. Contudo, a maioria dos isolados de *P. brasiliensis* empregados neste trabalho, apresentou morfogênese com transição da forma de levedura para micélio, completa ou incompleta, mesmo a 37°C, claramente a partir do quinto dia de incubação em RPMI 1640. Esta transição fenotípica foi mencionada em fungos dimórficos por outros autores ao se realizarem ensaios de determinação de CIM de antifúngicos por microdiluição em placa empregando o meio RPMI (NAKAI et al., 2003).

Alguns autores (NAKAI et al., 2003; KOHLER et al., 2004) e o protocolo do CLSI M27-A2 sugerem a suplementação do meio RPMI com 2% de glicose para o fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*. Ensaioando-se a determinação de CIM, a 37°C, no caldo RPMI com maior concentração de glicose não se

observou, para *P. brasiliensis*, alterações na transição morfológica de levedura para micélio. Interessantemente, não ocorreu transição de levedura para micélio quando foram empregados os meios MHM ou MVM. Estas observações sugerem que a composição dos meios usados no ensaio de determinação de CIM por microdiluição em placas, a 37°C, influencia a morfogênese de *P. brasiliensis*. Esta variação de fase pode influenciar nos resultados de CIM, visto que estruturas distintas do fungo (leveduras ou hifas e clamidósporos) podem estar presentes em proporções variadas nos orifícios da placa de microtitulação, em diferentes momentos.

Quando se testaram os derivados sulfamídicos (sulfametoxazol e bactrim), o meio MVM mostrou valores altamente divergentes, consideravelmente mais baixos, em comparação com RPMI e ao MHM, ou seja, foi possível observar mais claramente no meio MVM a atividade antifúngica do sulfametoxazol e da combinação sulfametoxazol-trimetropim em baixas concentrações. É interessante ressaltar aqui que os valores de CIM<sub>90</sub> para ambas as drogas, sulfametoxazol e bactrim no caldo MVM foram de 18,75 µg/mL ao passo que nos meio RPMI e MHM foram iguais a 300 e 150 µg/mL.

Desconhece-se a existência de algum antagonismo ou sinergismo entre os derivados sulfamídicos e os componentes do meio MVM (STEVENS & VO, 1982). Assim, os resultados indicam que a composição dos meios influenciou os valores de CIM em todas as amostras testadas. A interferência de diferentes meios de cultura nos valores de CIM para sulfametoxazol testados por microdiluição foi relatada por outros autores para fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Cryptococcus*. Essa interferência, à semelhança dos resultados do presente trabalho, foi notada quando se compararam os resultados obtidos em meios sintéticos ou complexos, suplementados ou não com ácido fólico ou seus precursores, explicação adequada face ao provável mecanismo de ação dessas drogas (HANAFY et al., 2007). De fato, conquanto amplamente utilizados na terapêutica da PCM, principalmente no Brasil, ainda não há na literatura trabalhos descritivos do mecanismo de ação de derivados sulfamídicos em *P. brasiliensis*. Em procariotos, todavia, os derivados sulfamídicos interferem na biosíntese de ácido fólico por competição com o ácido para-amino-benzóico (PABA) numa reação catalizada pela enzima dihidropteroato sintetase (DHPS) enquanto o trimetropim, avaliado no presente



trabalho em combinação com o sulfametoxazol, atua na mesma via biosintética, inibindo a enzima dihidrofolato redutase (DHFR). Como consequência, há um decréscimo na concentração de folato intracelular, essencial para a síntese de bases púricas e pirimídicas e, portanto, para o crescimento microbiano (VISBAL et al., 2005). Na verdade é importante destacar que a utilização de sulfamídicos não é usual na terapêutica de micoses sendo difíceis, em função disso, o acesso aos dados de susceptibilidade *in vitro* de fungos aos sulfamídicos, por incomum ou até mesmo raro na literatura pertinente, dificultando uma comparação dos valores aqui encontrados para a CIM de sulfametoxazol e a combinação sulfametoxazol-trimetropim (bactrim). Este mecanismo de ação difere dos outros antifúngicos testados neste trabalho.

Por outro lado, em função da acessibilidade a bancos de dados com sequências anotadas ([www.broadinstitute.org](http://www.broadinstitute.org)) correspondentes aos genomas de 3 linhagens (Pb18, Pb03 e Pb01) de *P. brasiliensis* foi possível comprovar a existência, nestes genomas, de sequências anotadas que apresentaram similaridade com as enzimas dihidropteroato sintetase (DHPS) e dihidrofolato redutase (DHFR), envolvidas na biosíntese de ácido fólico, a saber:

- a) Dihidropteroato sintetase: 1- *P. brasiliensis* Pb01: PAAG\_01324. 1: *proteína de síntese de ácido fólico*; 2 - *P. brasiliensis* Pb18: PADG\_00443.1 *dihidropteroato sintetase*; 3 - *P. brasiliensis* Pb03: PADG\_02046.1 *dihidropteroato sintetase*.
- b) Dihidrofolato redutase: 1 - *P. brasiliensis* Pb01 PAAG\_05944. 1: *dihidrofolato redutase*; 2 - *P. brasiliensis* Pb18 PADG \_ 06050.1.1: *dihidrofolato redutase*; 3 - *P. brasiliensis* Pb03 PABG\_05716.1: *dihidrofolato redutase*.

O meio sintético RPMI 1640 é suplementado com PABA (0,001 g/L) e com ácido fólico (0,001 g/L) (Anexo A). O meio MHM é um meio complexo, não é um meio quimicamente definido, com componentes orgânicos como extrato de carne e caseína hidrolisada, no qual o microrganismo certamente tem fontes de ácido fólico ou seus precursores. O meio MHM foi empregado porque há indicações de seu uso em ensaio de determinação de CIM por diluição em ágar com resultados que são referidos como padrão para a CIM de sulfamídicos frente a *P. brasiliensis* (RESTREPO & ARANGO, 1980) e porque foi capaz de

manter durante todo o tempo do experimento a morfologia leveduriforme, em cultivos submersos, a 37°C. Já o meio MVM é um meio sintético ou quimicamente definido (RESTREPO & JIMENEZ, 1980), que além de permitir a manutenção da morfologia leveduriforme em cultivos submersos, é suplementado apenas com ácido fólico (0,0001 g/L, inferior à do meio RPMI). Conquanto o meio MVM tenha sido utilizado com frequência em ensaios de determinação de CIM de antifúngicos (HAMDAN & REZENDE, 1988; HAHN & HAMDAN, 2000(a); HAHN & HAMDAN, 2000 (b); HAHN et al., 2002; HAHN et al., 2003; da SILVA et al., 2006), poucos autores o empregaram para a determinação *in vitro* da CIM de sulfametoxazol ou da combinação sulfametoxazol-trimetropim para *P. brasiliensis*, por meio de microdiluição (HAHN et al., 2003; da SILVA et al., 2006), onde somente 1 amostra foi analisada. Uma das dificuldades observadas experimentalmente quando do seu emprego nos ensaios de microdiluição foi o crescimento relativamente pequeno e mais lento das amostras. Este fenômeno de pouco crescimento foi também relatado por outros autores quando o ensaio de CIM usando o meio MVM foi testado em outros fungos (SANTOS & HAMDAN, 2005).

O antifúngico anfotericina B apresentou característica fungicida contra todas as amostras testadas em culturas provenientes de RPMI ou MHM. A anfotericina B se liga ao ergosterol e interrompe a integridade osmótica comprometendo a função da membrana celular fúngica como barreira entre o meio intra e extracelular (VISBAL et al., 2005). Hamdan e Resende (HAMDAN & REZENDE, 1988) demonstraram que a viabilidade de *P. brasiliensis* decresce progressivamente quando o tempo de exposição à droga aumenta. Esses autores também provaram que íons  $k^+$  foram liberados em poucos minutos quando as células foram incubadas com anfotericina B, e que a liberação de proteínas e ácido nucléico requereram um tempo maior de contato (HAMDAN & REZENDE, 1988) culminando em rápida ação fungicida. Os demais agentes antifúngicos testados neste trabalho, como derivados azólicos (itraconazol e fluconazol) e os derivados sulfamídicos (sulfametoxazol e bactrim) são fungistáticos e atuam por competição na via de biossíntese do ergosterol e na via de biossíntese do ácido fólico respectivamente (VISBAL et al., 2005). A atividade alternadamente fungicida ou fungistática dessas drogas está relacionada com a concentração testada e com o tempo de exposição.

Este fato pode resultar em diferentes atividades dos antifúngicos em leveduras de *P. brasiliensis* (HAHN & HAMDAN, 2000 (a)). Os resultados sugerem que a determinação de CIM por incubação em meio RPMI ou MHM poderia ter influenciado a atividade fungistática desses antifúngicos provavelmente por promover diferentes níveis de crescimento das amostras testadas, com a atividade fungicida de agentes primariamente fungistáticos mais evidente em meio MHM e variável para uma mesma amostra. A atividade da terbinafina contra *P. brasiliensis* é pouco estudada provavelmente porque esse antifúngico não é frequentemente utilizado no tratamento da PCM. Nossos resultados demonstraram que a terbinafina possui atividade fungicida mais evidenciada em meio RPMI. Hahn e colaboradores (HAHN et al., 2002) relataram valores de CIM similares para terbinafina e itraconazol contra *P. brasiliensis* pelo método de macrodiluição, chegando a sugerir a terbinafina como alternativa no tratamento da PCM. Os autores atribuíram essa similaridade ao fato desses antifúngicos possuírem mecanismos de ação similares, mas a atividade da terbinafina não foi estudada. Poucos são os trabalhos que testaram o caráter fungicida ou fungistática de compostos contra *P. brasiliensis* e os que o fizeram, considerou a possibilidade de sua utilização no tratamento da PCM (CAMPOS et al., 2009; JOHANN et al., 2010 (b); LIMA, et al., 2010).

O ensaio de determinação de CIM em meio sólido foi realizado objetivando-se compará-lo com os valores previamente obtidos em caldo RPMI, a 37°C, visando empregá-los na seleção de subpopulações de *P. brasiliensis* menos sensíveis a antifúngicos. A determinação de CIM por incorporação em ágar, acompanhada da incorporação de drogas em quantidades predeterminadas, já foi descrita para leveduras do gênero *Candida spp.* (RUBIO et al., 2003; CANTÓN et al., 2008; ESPINEL-INGROFF et al., 2010) e para fungos filamentosos (CANTON & ESPINEL-INGROFF, 2008; ARAUJO & ESPINEL-INGROFF, 2009). Esses estudos visaram uma comparação dos valores de CIM obtidos em ágar e em caldo objetivando estabelecer o melhor protocolo para uso na clínica. No entanto, poucos são os relatos sobre ensaios de determinação de CIM por incorporação em ágar frente a *P. brasiliensis* (RESTREPO & ARANGO, 1980). Os resultados mostraram que ocorrem diferenças significativas nos valores de CIM quando anfotericina B e itraconazol são testados em ágar em comparação com caldo, no meio RPMI

( $P < 0,05$ ) com valores mais baixos registrados nos ensaios em meios sólidos. A não correlação entre valores observados para anfotericina B em caldo ou ágar também foi observada por Canton & Espinel-Ingroff (CANTON & ESPINEL-INGROFF, 2008) quando testaram espécies de *Aspergillus* e para itraconazol e voriconazol quando testaram fungos zigomicetos. Os resultados do presente trabalho mostraram ainda, que não houve diferença significativa entre os valores de CIM em caldo e ágar para fluconazol ( $P > 0,05$ ). Rubio e colaboradores (RUBIO et al., 2003) também não encontraram divergências entre esses dois métodos quando testaram fluconazol contra leveduras da espécie *Candida*. É interessante observar que, embora os resultados aqui apresentados relativos ao sulfametoxazol e bactrim tenham sido obtidos em caldo RPMI e caldo MHM, as faixas intervalares de CIM encontrados foram equivalentes àqueles encontrados em ágar MHM por Restrepo e Arango (RESTREPO & ARANGO, 1980), já tendo sido destacadas acima as diferenças de valores registrados na sua determinação em MVM, um meio que, em função de sua composição, se mostrou mais adequado para a avaliação da atividade antifúngica de sulfametoxazol. Durante o seu crescimento, o fungo *P. brasiliensis* forma agregados celulares que poderiam crescer sobrepostos e assim, nem todas as células entrariam em contato com o ágar e o antimicrobiano nele dissolvido. Seria prudente esperar que os valores de CIM em ágar pudessem ser mais elevados que em caldo RPMI, onde as células de *P. brasiliensis* estariam submersas, mas não foi o que ocorreu. Os resultados indicam que o ágar forneceu valores equivalentes ( $P > 0,05$ ) de CIM para os antifúngicos sulfametoxazol e fluconazol, e foi capaz de influenciar os valores de CIM contra *P. brasiliensis* quando se testaram anfotericina B e itraconazol, de modo que as amostras apresentaram um perfil de maior susceptibilidade nestes antifúngicos. No entanto, a variação na morfologia foi menos aparente no meio RPMI sólido do que no caldo, onde apenas 14% das amostras apresentaram transição de levedura para micélio indicando que o cultivo submerso em placa influenciou mais na manifestação da morfogênese de levedura para micélio a 37°C.

A ausência da interpretação de pontos de corte (“breakpoints”) de agentes antifúngicos contra *P. brasiliensis* pode dificultar a classificação das amostras como sensível, resistente ou até mesmo resistente a múltiplas drogas

("MDR"). Esses pontos de corte podem ser obtidos através de estudos laboratoriais, que são bastante raros. Baseado em outros estudos *in vitro* (RESTREPO & ARANGO, 1980; HAMDAN & REZENDE, 1988; HAHN & HAMDAN, 2000 (a); HAHN & HAMDAN, 2000 (b); ESPINEL-INGROFF et al., 2002; HAHN et al., 2002; HAHN et al., 2003; NAKAI et al., 2003; da SILVA et al., 2006; CAMPOS, et al., 2009; JOHANN et al., 2010 (a e b), todas as amostras usadas neste trabalho foram sensíveis a todos os antifúngicos testados e em todas as condições analisadas. Segundo a literatura, uma amostra (isolado clínico recente) que apresentou CIM igual a 320 µg/mL, empregando a técnica de macrodiluição foi considerada resistente ao bactrim (HAHN et al., 2003). Os resultados aqui mostrados indicam que valores de CIM muito próximos a 320 µg/mL (300 µg/mL) foram encontrados para muitas amostras quando os antifúngicos sulfametoxazol e a bactrim foram testados utilizando os meios RPMI e MHM.

O conjunto dos resultados discutidos neste tópico nos permite questionar quais seriam as condições ideais para a realização do ensaio de determinação de CIM para o *P. brasiliensis* que fornecessem leituras mais confiáveis e com o menor intervalo de tempo. Por se tratar de um fungo de crescimento lento e muitas vezes de difícil isolamento, na prática, o ensaio de determinação de CIM seria problemático de ser aplicado rotineiramente na clínica uma vez que seriam necessários períodos longos para leitura da CIM quando comparado com microrganismos aos quais o ensaio é aplicado rotineiramente, como leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, cuja leitura pode ser realizada em 24 horas (CLSI M27 A-2). Ainda assim, o ensaio de determinação de CIM contra *P. brasiliensis* torna-se uma ferramenta muito interessante para estudos ambientais e de caracterização de amostras desse microrganismo. A leitura dos valores de CIM com o auxílio de MTT poderia oferecer uma alternativa para diminuir esse intervalo fornecendo uma leitura mais precisa e refinada. Os presentes resultados não mostraram diferenças significativas entre leitura por transmitância com MTT e leitura visual ( $P < 0,05$ ). Meletiadis e colaboradores (MELETIADIS et al., 2001) obtiveram resultado semelhante quando compararam leitura visual e leitura com auxílio de 2,3 di (2-metoxil-4-nitro-5-(sulfenilamina) carbonil – 2H- hidróxido tetrazólio ("XTT") para amostras de espécies de *Aspergillus* desafiadas contra anfotericina B e itraconazol. No

entanto, embora tenha sido possível a realização de análise estatística, nossos resultados não podem ser estendidos para todas as amostras de *P. brasiliensis* devido ao número insuficiente de amostras testadas (menos de 11), mínimo necessário para uma inferência aplicável a uma espécie microbiana. (SAMPAIO, 2002). Para a otimização dos experimentos com MTT seriam necessárias o triplo de placas de microtitulação utilizadas para a leitura por método visual, uma vez que teríamos que analisar os três intervalos de leitura (7, 10 e 15 dias) e a mesma placa não pode ser utilizada para mais de uma leitura.

As observações realizadas permitem supor que os resultados aqui apresentados constituem uma contribuição para o melhor conhecimento das variáveis que influenciam a determinação dos valores de CIM para diferentes antifúngicos frente a *P. brasiliensis*, principalmente aquelas relacionadas ao emprego de diferentes meios de cultura e condições associadas a cultivos submersos ou ao crescimento em superfície e especialmente para algumas drogas como anfotericina B, sulfametoxazol e a combinação sulfametoxazol-trimetropim. A tabela 33 sumariza as condições empregadas em estudos anteriores e no presente trabalho para determinação de CIM contra o complexo de espécies de *Paracoccidioides* propondo um protocolo provisório para a determinação de CIM baseados em nossos resultados atuais.

Os resultados envolvendo a padronização de condições experimentais para a realização de determinação de CIM contra *P. brasiliensis* por microdiluição possibilitaram a redação de um artigo que, neste momento, encontra-se em fase de correção para submissão.

Tabela 33: Condições empregadas em estudos anteriores e no presente trabalho para determinação de CIM contra o complexo de espécies de *Paracoccidioides*: um protocolo provisório baseado em nossos resultados atuais

| <b>Condições</b>         | <b>Referencias prévias</b>                         | <b>CLSI M27-A2</b>          | <b>Este trabalho</b>  | <b>Protocolo proposto</b>           |
|--------------------------|--|-----------------------------|---|-------------------------------------|
| Concentração do inóculo  | 1-5x10 <sup>3</sup> a 1-5x10 <sup>5</sup> céls/ mL | 1-5x10 <sup>3</sup> céls/mL | 1-5x10 <sup>3</sup> , 10 <sup>4</sup> e 10 <sup>5</sup> céls / mL | <b>1-5x10<sup>5</sup> céls / mL</b> |
| Temperatura de incubação | 35-37°C<br>e<br>Temperature ambiente               | 35-37°C                     | 35-37°C<br>e<br>Temperature ambiente                              | <b>35-37°C</b>                      |
| Meios de cultivo         | RPMI, MMH, MVM                                     | RPMI                        | RPMI*, MMH, MVM   | <b>MMH#</b>                         |
| Tempos de leitura        | 72 h a 8 dias                                      | 24-48 h                     | 7, 10 e 15 dias   | <b>15 dias</b>                      |
| Protocolos               | Macro e microdiluição                              | Microdiluição               | Microdiluição   | Microdiluição                       |

# MVM: Pode ser usado quando é necessário enfatizar a ação dos antifúngicos sulfametoxazol e Bactrim® contra *P. brasiliensis*.

\*RPMI quando usado a 37°C, podem ser encontradas formas miceliais do fungo.

## 6.2 Seleção de subpopulações de *P. brasiliensis* resistentes a antifúngicos

Os protocolos de múltiplos passos e passo único para seleção de linhagens resistentes a antimicrobianos, já foram executados anteriormente em diferentes modelos que incluem protozoários, bactérias (SADDI, 1995; PETRILLO-PEIXOTO E MOREIRA, 1996; GAZOLA ET AL., 2001; GARBACCIO, 2001; PIRES JÚNIOR, 2004) e para fungos como *Saccharomyces cerevisiae* (COWEN et al., 2005) e *Aspergillus fumigatus* (FERREIRA et al., 2004).

Os resultados mostraram que os procedimentos adotados em passo único não permitiram a seleção de clones de *P. brasiliensis* para os antifúngicos itraconazol e bactrim. O antifúngico itraconazol apresentou característica fungicida para o isolado Pb4 proveniente de ensaio de CIM em meio RPMI e a mesma característica para os isolados Pb4, Pb11 e Pb03 do ensaio de CIM em meio MHM. Valores inferiores de CIM foram detectados quando se realizou ensaio de detecção de CIM em ágar RPMI (0,0039 µg/mL para todos os isolados) em comparação com os valores em caldo RPMI. Essa diferença dos valores de CIM obtidos em meio sólido com àqueles obtidos por microdiluição talvez possa explicar a razão da não seleção de subpopulações dessas amostras. Contudo, a técnica de passo único permitiu obter crescimento de uma quantidade significativa de clones de diferentes amostras de *P. brasiliensis* quando se testou sulfametoxazol e fluconazol. Após sucessivos repiques em concentrações crescentes do antifúngico selecionaram-se clones com características estáveis que se mantêm em concentrações superiores aos valores das CIM dos antifúngicos sulfametoxazol e fluconazol. Novamente, a ausência de pontos de corte dificulta a caracterização dos clones em sensível ou resistente, e neste caso, ainda deve-se levar em consideração o termo tolerante.

A resistência clínica, por outro lado, pode ser definida como a falha de um paciente infectado em responder ao tratamento com antifúngicos mesmo quando a máxima dosagem permitida é administrada (SANGLARD et al., 2009). O fenômeno de resistência clínica é relatado em pacientes com PCM quando estes são tratados com derivados sulfamídicos, principalmente a



combinação sulfametoxazol-trimetoprim (bactrim). Essa resistência é atribuída a diferentes fatores dentre eles a mudança hormonal em mulheres na menopausa, quando a proteção mediada por estrogênio é perdida; longos períodos de tratamento seguido muitas vezes do abandono pelo paciente por considerar-se curado quando os sintomas diminuem; elevadas dosagens do antifúngico no período inicial do tratamento e posterior redução na dosagem devido à diminuição dos sintomas e atenuação dos efeitos colaterais, permitindo a recuperação gradual do sistema imune com formação de granulomas e fibrose tecidual que tornam mais difícil a penetração do antifúngico. Esses fatores acabam por levar a busca por novas abordagens terapêuticas para o tratamento da PCM (IZIDORO al., 2007; TRAVASSOS et al., 2008; ARAÚJO et al., 2008; MARTINEZ et al., 2010). A resistência clínica pode ser observada mesmo quando não ocorre a resistência do microrganismo medida *in vitro* (SANGLARD et al., 2009).

Os resultados obtidos nesse trabalho durante a seleção de amostras menos susceptíveis a sulfametoxazol e fluconazol não permitem a correlação com a resistência clínica, uma vez que experimentos *in vivo* não foram realizados. Por outro lado, a resistência *in vitro* pode ser compreendida como um aumento nos valores de CIM para determinado microrganismo quando comparado com as células controle que ainda exibem fenótipo de susceptibilidade ao antifúngico. Como essa determinação é realizada fora do contexto clínico, essa resistência é referida como sendo microbiológica (SANGLARD et al., 2009). Com base nessa definição e na proposição de alguns autores (RESTREPO e ARANGO, 1980; HAHN et al., 2003), sugerimos inicialmente a classificação dos clones selecionados neste trabalho como resistentes a concentrações variadas de sulfametoxazol e fluconazol. Contudo, quando se desafiou os clones selecionados de *P. brasiliensis* novamente ao ensaio de determinação de CIM em caldo RPMI para os antifúngicos anfotericina B, itraconazol, cetoconazol, fluconazol, sulfametoxazol, bactrim e terbinafina, registrou-se algumas divergências nos valores da CIM com relação às suas amostras parentais. Algumas amostras não foram capazes de manter o fenótipo selecionado e ainda, apresentaram uma significativa redução nos valores de CIM para outros antifúngicos. Esse resultado poderia indicar que estas não seriam amostras resistentes e sim tolerantes a concentrações

crecentes do antifúngico se, por tolerância entendermos que essa ocorre quando uma determinada amostra é capaz de sobreviver à ação do antifúngico sem expressar ou usar mecanismos de resistência (LEWIS, 2007). Por outro lado, a redução dos valores de CIM observada para outros agentes antifúngicos poderia indicar uma alteração no perfil de expressão gênica transitória ou permanente nessas amostras.

A regulação transcricional parece ser o ponto chave para o desenvolvimento da resistência a antifúngicos. A aquisição da resistência por espécies antes sensíveis é mediada em muitos casos por exposição às drogas, resultando em uma mudança transitória na expressão gênica importante para a resposta fúngica. A remoção do antifúngico em geral reverte à transcrição para níveis normais (SANGLARD et al., 2009). A análise da estabilidade do fenótipo dos clones selecionados em concentrações crescentes de antifúngicos por meio de repiques sucessivos na ausência de sulfametoxazol não levou à reversão do fenótipo de resistência quando novamente desafiados na presença do antifúngico, havendo, portanto, estabilidade do fenótipo selecionado. A pressão seletiva mediada por antifúngicos, especialmente quando exercida por um longo tempo, pode eventualmente levar ao aparecimento de mutações ou rearranjos cromossômicos na célula fúngica. Esses eventos podem afetar genes de resistência a drogas, cuja expressão poderá determinar aquisição de resistência (SANGLARD et al., 2009). Ferreira e colaboradores (FERREIRA et al., 2004) relataram que a resistência a itraconazol em amostras de *Aspergillus fumigatus* estaria relacionada com expressão de mutações nos genes *CYP51A* e *CYP51B*, que codificam a enzima 14 $\alpha$ -demetilase e da superexpressão de transportadores relacionados a bombas de efluxo. Os mecanismos moleculares de resistência a múltiplas drogas mediada por bomba de efluxo encontram-se caracterizados em muitos organismos modelo como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *A. fumigatus* (MORSCHHÄUSER, 2010). Recentemente foi demonstrado o papel importante da proteína *Hsp90* na evolução da resistência a antimicrobianos, especialmente fluconazol, em *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, melhor observada quanto essa resistência é adquirida por seleção rápida do que quando ocorre uma seleção gradual para esse antifúngico. A seleção rápida promove uma condição de estresse celular maior necessitando de uma maior expressão de *Hsp90* que

acaba por selecionar linhagens que possuam mutações no gene *ERG11* que previnem o acúmulo de esteróis  $14\alpha$ -metilados, tóxicos à célula fúngica, exibindo um fenótipo de resistência a fluconazol. Ainda pode ser responsável pela mudança nos níveis de transcrição de *GCN4*, um regulador global de transcrição, ativado em condições de estresse. (COWEN & LINDQUIST, 2005; COWEN, 2009; ROBBINS et al, 2010). Alguns trabalhos em *Saccharomyces cerevisiae* têm demonstrado que a resistência a sulfametoxazol pode ocorrer devido a um aumento na expressão da enzima dihidropteroato sintetase acarretando em aumento na síntese de ácido fólico (ILIADES et al., 2003 e 2004). Estudos adicionais serão necessários para a compreensão dos mecanismos moleculares que levaram os clones de amostras de *P. brasiliensis* selecionados neste trabalho a apresentarem fenótipo de menor susceptibilidade ou de maior resistência em concentrações crescentes de sulfametoxazol ou fluconazol.

Durante o processo de seleção de subpopulações de *P. brasiliensis*, uma amostra apresentou uma variação morfológica em temperatura ambiente exibindo um fenótipo leveduriforme que posteriormente mostrou-se estável independente da presença de sulfametoxazol. Esse fenótipo não se repetiu para as demais amostras.

Muitas evidências indicam que a temperatura poderia ser o único fator que controla em *P. brasiliensis*, a conversão da forma M para a forma L (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1994, TOLEDO et al., 1999; GOLDMAN et al., 2003). As alterações associadas à morfogênese em *P. brasiliensis* são complexas e acompanhadas, entre outras, de reorganização dos lipídios da membrana, alterações na composição da parede celular, com aumento na quantidade de quitina e alteração da estrutura de glucanas, polímero predominante, que passa de predominantemente  $\beta$ -1,3-glucana (no micélio) para  $\alpha$ -1,3 glucana (na levedura) (SAN-BLAS & NIÑO-VEGA, 2001).

Como a transição dimórfica está relacionada ao processo de infectividade do fungo, há pesquisadores interessados na expressão gênica diferencial entre as duas formas, visto que a interferência com o processo de conversão da fase M para L, ou com a proliferação da forma L no hospedeiro pode permitir o bloqueio da evolução da PCM infecção para PCM doença. A conversão morfológica para levedura é necessária para a efetivação da doença

e a morfologia leveduriforme parece oferecer proteção contra células do sistema imunológico do hospedeiro como neutrófilos, monócitos e macrófagos (KLEIN & TEBBETS, 2007). Marques e colaboradores verificaram que 20 genes têm expressão aumentada na fase L incluindo o gene *AGS1*, que codifica  $\alpha$ -1,3-glucana sintetase cujo produto, as  $\alpha$ -1,3-glucanas, estão presentes preferencialmente na parede celular da forma L (MARQUES et al., 2004). Felipe e colaboradores analisando o perfil transcricional de genes do *P. brasiliensis* na fase L e M verificaram a expressão diferencial de 10 genes relacionados com biossíntese e manutenção da parede celular, como quitinas sintetases,  $\alpha$  e  $\beta$ -glucanas sintetases (FELIPE et al., 2005 (a)). Nunes e colaboradores verificaram que o gene *4-HPPD* (que codifica 4-hidroxil-fenil-piruvato desidrogenase), enzima envolvida no catabolismo de fenilalanina e tirosina, encontra-se altamente expressa durante a fase L. O produto desse gene é inibido por NTBC (2-2-nitro-4-fluorometilbenzoil-ciclohexano-1,3-diodo), substância que impediu a transição de micélio para levedura em *P. brasiliensis*, sugerindo que 4-HPPD é potencial alvo terapêutico (NUNES et al., 2005). Vários genes envolvidos na organização celular, metabolismo e transporte de íons apresentam expressão diferenciada em *P. brasiliensis* quando as duas morfologias são analisadas (ANDRADE et al., 2006). Um trabalho recente revelou a importância da calcineurina para a manutenção da homeostasia do cálcio e morfogênese durante a transição da M  $\rightarrow$  L no *P. brasiliensis* (CAMPOS et al., 2008). Almeida e colaboradores (ALMEIDA et al., 2009) relatam que a proteína Cdc42 da família GTPase, está envolvida em diferentes processos celulares em *P. brasiliensis* incluindo crescimento e morfogênese. Ocorrem ainda, estudos relacionando a função da proteína de choque térmico *Hsp90* de *P. brasiliensis*, como adaptação do microrganismo ao aumento de temperatura, dimorfismo e sobrevivência no tecido hospedeiro (NICOLA et al., 2008).

Modificações da parede celular em decorrência de mecanismos de estresse já foram descritos por outros autores. Por outro lado, há evidências de que, além da temperatura, outros fatores podem interferir na transição dimórfica do *P. brasiliensis*, como por exemplo, fatores que levam a um estresse celular. O farnesol, presente em muitos óleos essenciais, provoca a morte das células do fungo através de danos causados nas organelas

citoplasmáticas quando o microrganismo é exposto a altas concentrações desse álcool. No entanto, em baixas quantidades, até 25  $\mu$ M, não causam morte celular, porém impedem a transição L  $\rightarrow$  M quando cultivados a 25°C (DERENGOWSKI et al., 2009). Tomazett e colaboradores (TOMAZETT et al., 2011) mostraram que o estresse provocados pela exposição a diferentes agentes como SDS, KCl, NaCl e sorbitol alteram o perfil de expressão de genes envolvidos com a síntese da parede celular. Borges e colaboradores (BORGES et al., 2011) demonstraram a existência de expressão diferencial de transcritos para resposta a condições de estresse e morfogênese entre amostras de referência de *P. brasiliensis* com uma amostra (Pb4940) que exhibe alteração morfológica em 37°. Essa amostra foi isolada de líquido cefalorraquidiano de um paciente do sexo feminino e posteriormente, em cultivos de laboratório, verificou-se que esse isolado de *P. brasiliensis* mantém uma morfologia filamentosa quando cultivada em 37°C (OKAMOTO, 2003). Esses estudos indicam que as alterações celulares devem ser muito complexas e extensas, envolvendo a expressão diferencial de numerosos genes, pertencentes a várias categorias funcionais e envolvidas em vias metabólicas distintas (FELIPE et al., 2003; GOLDMAN et al., 2003; SILVA et al., 2008).

Na interpretação dos resultados aqui relatados considerou-se que as evidências são favoráveis à hipótese de não ser a temperatura o único fator responsável pela transição dimórfica em *P. brasiliensis* e sugerem que fatores associados à composição do meio de cultura e a drogas como sulfametoxazol e fluconazol atuaram como um mecanismo de estresse adicional para algumas amostras do fungo induzindo a transição independente da temperatura. Vários estudos utilizaram a análise do perfil diferencial de expressão gênica cultivando amostras de *P. brasiliensis* em ambas às temperaturas.

Hahn e colaboradores (HAHN et al., 2002) relataram o isolamento a partir de pacientes cronicamente infectados vivendo no Brasil, de 2 amostras de *P. brasiliensis* que apresentaram um perfil considerado atípico pelos autores, peculiaridade esta que consistia em manter-se leveduriforme mesmo em cultivos à temperatura ambiente. Até onde se tem conhecimento, o relato do presente trabalho é o primeiro isolamento de clone com bloqueio no dimorfismo térmico mantendo fenótipo leveduriforme estável na temperatura ambiente obtido a partir de uma amostra mantida em laboratório e amplamente

utilizada na preparação de antígenos, a amostra B339, e o primeiro relato de seleção de clones que apresentam menor sensibilidade ou resistência a sulfametoxazol e fluconazol, também a partir de amostras mantidas em coleções de laboratório. Espera-se que estes clones venham a ser aplicáveis a estudos da fisiologia do fungo por meio análises bioquímicas, genéticas e moleculares, com potencial para contribuir para a melhor compreensão das interações microrganismo-hospedeiro e da patogênese da paracoccidiodomicose.

## 7. Conclusões e Perspectivas

Com base nos resultados obtidos ao longo desse trabalho foi possível chegar às seguintes conclusões:

- ✓ O ensaio de determinação de concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição é apropriado e reprodutível e pode ser utilizado em *P. brasiliensis* desde que sejam feitas as modificações necessárias;
- ✓ O período de 15 dias de incubação foi o mais apropriado para a leitura dos resultados de CIM para *P. brasiliensis* nas condições testadas neste trabalho, uma vez que não ocorre crescimento satisfatório antes de 7 dias de incubação para diversas amostras;
- ✓ Os valores de CIM sofrem alteração dependendo do meio de cultura (RPMI, MHM ou MVM) e do protocolo utilizado no ensaio (microdiluição ou diluição em ágar); As variações de CIM são mais proeminentes em RPMI que MHM ou MVM, quando o tempo de incubação é analisado;
- ✓ A temperatura de incubação influencia diretamente os valores de CIM, com maiores valores registrados quando se incubou em temperatura ambiente;
- ✓ As amostras de *P. brasiliensis* usadas neste trabalho se mostraram mais sensíveis a anfotericina B quando foi utilizado o método de diluição em ágar RPMI;
- ✓ Determinados antifúngicos mostraram-se alternadamente fungistáticos ou fungicidas para *P. brasiliensis* em função do meio de cultura utilizado no ensaio de determinação de CIM;
- ✓ O meio MVM mostrou-se o mais efetivo para a observação da atividade antifúngica e determinação de CIM de sulfametoxazol e



da combinação sulfametoxazol-trimetropim (bactrim) para *P. brasiliensis*;

- ✓ A metodologia de seleção de subpopulações de *P. brasiliensis* utilizada neste trabalho se mostrou eficiente na seleção de clones resistentes a sulfametoxazol e fluconazol e ineficiente para a seleção em itraconazol e bactrim;
- ✓ O cultivo em caldo RPMI durante o ensaio de determinação de CIM a 37°C e o cultivo em concentrações elevadas de antifúngicos foram responsáveis, independentemente, pela ocorrência de mudanças morfológicas associadas ao dimorfismo em amostras de *P. brasiliensis*, sugerindo que a temperatura não seria o único fator responsável pela transição dimórfica em *P. brasiliensis*.

O trabalho realizado permitiu a seleção de supopulações de *P. brasiliensis* que exibiram não só resistência a antifúngicos como também morfologia atípica leveduriforme estável em temperatura ambiente. Esse resultado abre novas perspectivas para diferentes pesquisas envolvendo a fisiologia do fungo e a patogênese da PCM uma vez que a transição dimórfica de micélio para a levedura está diretamente relacionada com a sobrevivência no hospedeiro humano.

Amostras de *P. brasiliensis* resistentes a sulfametoxazol e fluconazol, e que exibem morfologia leveduriforme à temperatura ambiente podem representar importante ferramenta para a compreensão da biologia e fisiologia desse microrganismo, no que se refere aos processos biológicos relacionados com a regulação do dimorfismo, resistência e mecanismos de estresse.

## 8. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, A. J.; CUNHA, C.; CARMONA, J. A. et al. *Cdc42p* controls yeast-cell shape and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology*, doi: 10.1016/j.fgb.2009.08.004.

ALMEIDA, A. J.; MATUTE, D. R.; CARMONA, J. A. et al. Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: low cytometry and *GP43* sequence analysis. *Fungal Genetics and Biology*, v. 44, p. 25-31, 2007.

ANDERSON, J. B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nature Reviews*, v. 3, p. 547-556, 2005.

ANDRADE, R. V.; PAES, H. C.; NICOLA, A. M. et al. Cell organization, sulphur metabolism and ion transport-related genes are differentially expressed in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium and Yeast cells. *BMC Genomics*, 7 (208): 1-13, 2006.

ARAUJO, R. & ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of assessment of oxygen consumption, Etest, and CLSI M38-A2 broth microdilution methods of evaluation of the susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to posaconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 4921-4923, 2009.

ARAUJO, S. A.; PRADO, L. G. R.; VELOSO, J.M. et al. Case of recurrent PCM: 25 years after initial treatment. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 13 (5): 402, 2008.

ARISTIZABAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. et al. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. *Infect. Immun.*, v.66, p.5587-5591, 1998.

BAGAGLI, E., THEODORO, R. C.; BOSCO, S. M. G. et al. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia*, 165:197-207, 2008.

BAGAGLI, E.; BOSCO, S. M. G.; THEODORO, R. C. et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal host that explain several biological features of the pathogen. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 6, p. 344-351, 2006.

BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO, S. M. et al. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): a ecological study. *Medical Mycology*, v. 41, p. 217-223, 2003.

BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis*, from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic área of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.*, V. 4, p. 505-512, 1998.

BETHIEM, E. P.; CAPONE, D.; MARANHÃO, B. et al. Paracoccidioidomycosis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, v. 5, p. 319-325, 1999.

BIALEK, R.; IBRICEVIC, A.; AEPINUS, C. et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by nested PCR assay. *Journal Clinical of Microbiology*, 38: 2940-2942, 2000.

BORGES, C. L.; BAILÃO, A. M.; BÃO, S. N. et al. Genes potentially relevant in the parasitic phase of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*, 171:1-9, 2011.

BOSCO, S. M. G.; THEODORO, R. C.; MACORIS, S. A. G. et al. Morphological and molecular characterization of the first isolate of *Paracoccidioides brasiliensis* from dog (*Canis familiaris*) In: *International Meeting on Paracoccidioidomycosis*, v. 47, p. 62, 2005.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clinical Microbiology Review*, v.6, p. 89-117, 1993.

CAMPOS, C. B. L.; BENEDETTE, J. P. T.; MORAIS, F. V. et al. Evidence for the role of calcineurin in morphogenesis and calcium homeostasis during mycelium-to-yeast dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryotic Cell*, v. 7, p. 1856-1864, 2008.

CAMPOS, F. F.; JOHANN, S.; COTA, B. B. et al. Antifungal activity of trichothecenes from *Fusarium* sp. against clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycoses*, 2010 Doi:10.1111/j.1439-0507.2009.018.x.

CANO, M. I. N. et al. Electrophoretic karyotype and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal Clinical Microbiology*, v. 36, p. 742-747, 1998.

CANTON E. & ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of neo-sensitabs tablet diffusion assay with CLSI broth microdilution M38-A and disk diffusion methods for testing susceptibility of filamentous fungi with amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 1793-1803, 2008.

CANTON E., PEMÁN, J.; ESPINEL-INGROFF, A. et al. Comparison of disc diffusion assay with the CLSI reference method (M27-A2) for testing *in vitro* posaconazole activity against common and uncommon yeast. *Journal of Clinical Microbiology*, 61: 135-138, 2008.

CARRERO, L. L.; NIÑO-VEGA, G.; TEIXEIRA, M. M. et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen fungal. *Genetics Microbiology*, 45: 605-612, 2008.

CHAVÉZ, A. T.; ROMERO, R. R.; RODRIGUEZ, J. A. et al. Disseminated Paracoccidioidomycosis in a Southern two-toed sloth (*Choloepus didactylus*). *J. Comp. Path*, v 144, p. 231-234, 2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute, Método de Referência para Detecção de CIM por Difusão em Disco: Norma Aprovada – CLSI M100-S18, 2008, Siemens Healthcare Diagnostics Inc.

Committee Laboratory Standards Institute. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – Segunda edição. Documento M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4). Wayne, P.A.: Committee Laboratory Standards Institute, vol. 22, nº 15, 2002.

Committee Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A2. *Committee Laboratory Standards Institute*, Wayne, P.A., 2002.

CORREDOR, G. G.; CASTAÑO, J. H.; PERALTA, L. A.; Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colômbia. *Ver. Iberoam. Micol.*, v. 16, p. 216-220, 1999.

CORREDOR, G.G.; PERALTA, L.A.; CASTAÑO, J.H. et al. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular identification of the isolate. *Medical Mycology*, v. 43, p. 275-280, 2005.

COSTA, C.S.; ALBUQUERQUE, F. C.; ANDRADE, R. V. et al. Transporters in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome: insights on drug resistance. *Genetic and Molecular Research*, v. 4, p. 390-408, 2005.

COUTINHO, Z. F.; da SILVA, D.; LAZÉRA, M. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública*, v. 18. p. 1441-1454, 2002.

COWEN, L. E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nature Reviews Microbiology*, 6:187-198, 2008.

COWEN, L. E. Hsp90 orchestrates stress response signaling governing fungal drug resistance. *Plos Pathogens*, 5: 1000471, 2009.

COWEN, L. E. & LINDQUIST, S. Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science*, vol 309: 2185-2189, 2005.

da SILVA, M. B.; MARQUES, A. F.; NOSANCHUK, J. D. et al. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes and Infection*, v. 8, p. 197-205, 2006.

de FARIAS, M. R.; CONDAS, L. A.; RIBEIRO, M. G.; et al. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia*, 172: 147-152, 2011.

DERENGOWSKI, L. S.; SILVA, C. S.; BRAZ, S. V. et al. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 8, p. 1-9, 2009.

ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeast. *Journal clinical of Microbiology*, 36: 2950-2956., 1998.

ESPINEL-INGROFF, A.; CANTON, E.; PEMAN, J. et al. Comparison of anidulafungin MICs determined by the clinical and laboratory standards institute broth microdilution method (M27-A3 document) and Etest for *Candida* species isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54: 1347-1350, 2010.

ESPINEL-INGROFF, A.; CHATURVEDI, V.; FOTHERGILL, A. et al. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentration of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. *Journal clinical of Microbiology*, 40: 3776-3781, 2002.

FEITOSA, L. S.; CISALPINO, P. S.; SANTOS, M. R. M. et al. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 39, p. 60-69, 2003.

FELIPE, M. S. S.; ANDRADE, R. V.; ARRAES, F. B. M. et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 26: 24706-24714, 2005 (a).

FELIPE, M. S. S.; TORRES, F. A. G.; MARANHÃO, Q. et al. Functional genome of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Immunology and medical Microbiology*, v. 45, p. 369-381, 2005 (b).

FELIPE, M. S. S.; TORRES, F. A. G.; MARANHÃO, Q. et al. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast*, v. 20, p. 263-271, 2003.

FERREIRA, M. E. S.; CAPELLARO, J. L.; MARQUES, E. R. et al. In vitro evolution of itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* involves multiple mechanisms of resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (11): 4405-4413, 2004.

FERREIRA, M. E. S.; MARQUEZ, E. R.; MALVAZI, I. et al. Transcriptome analysis and molecular studies on sulfur metabolism in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Molecular Genetics Genomics*, 276: 450-463, 2006.

FERREIRA, M. S. Paracoccidioidomycosis. *Paediatric Respiratory Reviews*, 10: 161-165, 2009.

FERREIRA, M. S.; FREITAS, L. H.; LACAZ, C. S. et al. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dog food



contaminated with soil in Uberlandia, Brazil. *Journal Medicine Veterinary Mycology*, v. 28, p. 253-256, 1990.

FONSECA, C. A.; JESUINO, R. S. A.; FELIPE, M. S. et al., Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and Infection*, v. 3: 535-543, 2001.

FONTANA, F. F.; SANTOS, T. B.; ESTEVES, F. M. et al. Seroepidemiological survey of Paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia*, DOI 10.107/s11046-009-9241-5, 2009.

GARBACCIO, J. L. Obtenção e caracterização in vitro de linhagens de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* resistentes a clorexidina. Dissertação, Mestrado em Microbiologia, U.F.M.G., 2001.

GAZOLA, K.C.P.; FERREIRA, A.V.B.; ANACLETO, C. et al. Cell surface carbohydrates and *in vivo* infectivity of glucantime sensitive and resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis* cell lines. *Parasitology Research*, v.87, p.935-940, 2001.

GERARDIN, H. & LATGÉ, J-P. DNA extraction and quantification. In: Molecular biology of pathogenic fungi. MARESCA, B. & KOBAYASHI, G. S. (Eds). New York: Telos Press, P.5, 1994.

GEZUELE, E. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp. de hences pinguino de la Antártica, res. B2. *Resumenes IV Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomycosis*, Caracas, Venezuela, 1989.

GOLDMAN, G. H. et al. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryotic Cell*, v. 2, p. 34-48, 2003.

GONZALEZ, J. F. MONTIEL, N. A. & MAASS, R. L. First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioidomycosis in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 12, p. 659-662, 2010.

GÖRG, A. 2-D Electrophoresis principles and methods. *From GE Healthcare*, p. 168, 2004.

HAHN, R. C. & HAMDAN, J. S. Effects of amphotericin B and three azole derivatives on the lipids of yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 44, p. 1997-2000, 2000 (a).

HAHN, R. C. & HAMDAN, J. S. *In vitro* susceptibilities of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal drugs. *Mycosis*, v. 43, p. 403-407, 2000 (b).

HAHN, R. C.; CONCEIÇÃO, Y. T.; SANTOS N. L. et al. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and *in vitro* resistance to ketoconazole and trimetoprim sulphamethoxazole. *Mycoses*, v. 46, p. 342-347, 2003.

HAHN, R. C.; FONTES, C. J. F.; BATISTA, R. D. et al. *In vitro* comparison of activities of terbinafine and itraconazole against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 2828-2831, 2002.

HAMDAN, J. S. & RESENDE, M.A. Lipid composition and effect of amphotericin B on yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathology*, v. 102, p. 97-105, 1988.

HANAFY, A.; UNO, J.; MITANI, H. et al. *In vitro* antifungal activities of sulfa drugs against clinical isolates of *Aspergillus* and *Cryptococcus* species. *Journal Medical Mycology*, 47:47-50, 2007.

ILIADES, P.; BERGLEZ, S.; MESHNICK, S. et al. Promoter strength of folic synthesis genes affects sulfa drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Drug Resistance*, 9 (3): 249-256, 2003.

ILIADES, P.; MESHNICK, S. R. & MACREADIE, I. G. Dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jiroveci* can affect sulfamethoxazole resistance in a *Saccharomyces cerevisiae* model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (7): 2617-2623, 2004.

IZIDORO, A. C.; da SILVA, P. C.; RIBAS, M. O. et al. Case of recurrent paracoccidioidomycosis in female 10 years after initial treatment. *Bull Tokyo Dent. Coll*, 48 (2): 67-72, 2007.

JOHANN, S.; CISALPINO, P. S.; WATANABE, G. A. et al. Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Pharmaceutical Biology*, 48 (4): 388-396, 2010 (a).

JOHANN, S.; SÁ, N. P.; LIMA, L. ARS et al. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9: 2-6, 2010 (b).

KLEIN, B. S. & TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 10: 314-319, 2007.

KOHLER, L. M. Complexo *Sporothrix schenckii*: susceptibilidade às drogas antifúngicas. Tese de Doutorado em Microbiologia, ICB, UFMG, 2008.

KOHLER, L. M.; MONTEIRO, P. C. F.; HAHN, R. C. et al. In vitro susceptibilities of isolates of *Sporothrix schenckii* to itraconazole and terbinafine. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (9): 4319-4320, 2004.

KONTOYANNIS, D. P. & LEWIS, R.E. Antifungal drugs resistance of pathogenic fungi. *Lancet.*, v. 359, p. 1135-1144, 2002.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F. & PERAÇOLI, M. T.S. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.40, 3: 125-135, 1998.

LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence, taxonomy. In: *Paracoccidioidomycosis*. FRANCO, M., LACAZ, C. S., RESTREPO-MORENO, A. DEL NEGRO, G. (Eds) Boca raton, p. 13-25, 1994.

LONDERO et al., *Mycopathologia*, 29: 72 (1):17-19, 1980.

LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*, 5:48-56, 2007.

LI, W.; METIN B.; WHITE, T. C. Et al. Organization and evolution trajectory of the mating type (*MAT*) locus in dermatophyte and dimorphic fungal pathogens. *Eukaryotic Cell*, vol 9: 46-58, 2010.

LIMA, L. A.R.S.; JOHANN, S. CISALPINO, P. S. et al. Antifungal activity of 9-hydroxy-folianin and sucrose octaacetate from the seeds of *Annoma cornifolia* A. St. –Hil (Annonaceae). *Food Research International* (2010), doi: 10.1016/j.foodres.2010.11.030.

MACEDO, R.; LACERDA, M.; REIS, R. T. Infecção natural de tatus por *Paracoccidioides brasiliensis* em Serra da Mesa, Goiás: estudo preliminar. *Anais do II Congresso Brasileiro de Micologia*, abstract 182, Rio de Janeiro, 1998.

MARINI, M. M.; ZANFORLIN, T. ; SANTOS, P. C. et al. Identification and characterization of TC1/mariner-like DNA transposons in genome of the pathogenic fungi of the *Paracoccidioides* species complex. *BMC Genomics* 11:1-20, 2010.

MARQUES, E. R.; FERREIRA, M. E. S.; DRUMMOND, R.D. et al. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of

*Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 271, p. 667-677, 2004.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43: 480, 2010.

MATUTE D.R.; TORRES, I.P.; SALGADO-SALAZAR, C. et al. Background selection at the chitin synthase II (*chs2*) locus in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetic Microbiology*, 20: 125-131, 2007.

MATUTE, D.R.; McEWEEN, J. G.; MONTES, B. A. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Molecular Biology Evol.*, 23: 65-73, 2006.

McEWEN, J. G.; RESTREPO, B. I.; SALAZAR, M. E. et al. Nuclear staining of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Journal Medical Veterinary Mycology*, v. 2, p. 343-34, 1987.

MELETIADIS, J.; MOUTON, J. W.; MEIS, J. F. G. M. et al. Comparison of spectrophotometric and visual readings of NCCLS method and evaluation of a colorimetric method based on reduction of a soluble tetrazolium salt, 2,3-bis <2-methoxy-4-nitro-5-(sulfenylamino) carbonyl- 2-H-tetrazolium-hydroxyde>, for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 39:4256-4263, 2001.

MONTENEGRO, M. R. & FRANCO, M. Pathogenesis. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A. M. in: *Paracoccidioidomycosis* (Ed) Boca Raton, p. 131-150, 1994.

MONTENEGRO, M. R.; MIYAJI, M. ; FRANCO, M. et al. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, state of São Paulo, Brasil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 6, 1996.

MORAIS, F. V.; BARROS, T. F.; FUKADA, M. K. et al. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal Clinical of Microbiology*, 38: 3960-3966, 2000.

MORSCHHÄUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 47: 94-106, 2010.

NAIF, R. D.; BARRETO, T. Novos registros de *P. brasiliensis* em tatus (*Dasypus novemcinctus*). *Anais do Congresso Brasileiro de Parasitologia*, Abstract 197, Rio de Janeiro, 1989.

NAIF, R. D.; FERREIRA, L. C. L.; BARRET, T. V. et al. Paracoccidioidomicose em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, v. 28, p. 19-27, 1986.

NAKAI, T.; UNO, J.; IKEDA, F. et al. In vitro antifungal activity of micafungin (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 1376-1381, 2003.

NEGRONI, R. Pathogenesis. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A. M. in: *Paracoccidioidomycosis* (Ed) Boca Raton, p. 203-211, 1994.

NICOLA, A. M.; ANDRADE, R. V.; DANTAS, A. S. et al. The stress responsive and morphologically regulated HSP90 gene from *Paracoccidioides brasiliensis* is essential to cell viability. *BMC Microbiology*, 8 (158): 1-9, 2008.

NIÑO-VEGA, G.A.; BUURMAN, E.T. GOODAY, G.W. et al. Molecular cloning and sequencing a chitin syntase gene (CHS<sub>2</sub>) of Pb yeast, v.14, p.181-187, 1998.

NOSANCHUK, J.D. & CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, v. 5, p. 203-223, 2003.

NUNES, L. R.; OLIVEIRA, R. C.; LEITE, D. B. et al. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryotic Cell*, v. 4, p. 2115-2158, 2005.

OKAMOTO, H. T. S. Pb4940: um isolado de *Paracoccidioides brasiliensis* com dimorfismo atípico e estrutura gênica alterada. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás, Goiás, Brasil, 2003.

OLIVEIRA, G. G.; SILVEIRA, L. H.; ITANO, E. N. et al. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* in chickens from Paraná, and Mato Grosso do sul states, Brazil. *Mycopathologia*, DOI 10.1007/s 11046-010-9366-6, 2010.

PETRILLO-PEIXOTO, M.L. & MOREIRA, E.S.A. *Leishmania (V) guianensis*: isolation and characterization of glucantime-resistant cell lines. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 944-949, 1996.

PINZAN, C. F.; RUAS, L. P. CASABONA-FORTUNATO, A. S. et al. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Plosone*, vol. 5: e10757, 2010.

PIRES-JUNIOR, D. R. Caracterização molecular de linhagens de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em função da susceptibilidade a clorexidina. Tese, Doutorado em Microbiologia, U.F.M.G., 2004.

PLONKA, M. P. & GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms- biotechnological and medical aspects. *Acta Bioquímica Polonica*, 53 (3): 429-443, 2006.

PRADO, M.; da SILVA, M. B.; LAURENTI, R. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brasil: a review from 1996 to 2006. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104 (3): 513-521, 2009.

PUCCIA, R.; McEWEN, J. G.; MENDOZA, L. et al. Diversity in *Paracoccidioides brasiliensis*: the PbGP43 gene as a genetic marker. *Mycopathologia*, 165: 275-287, 2008.

RAMOS-E-SILVA, M. & SARAIVA, L. E. S. Paracoccidioidomycosis. *Dermatology Clinical*, 26: 257-269, 2008.

RESTREPO, A. & JIMENEZ, B. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *Journal Clinical of Microbiology*, 12: 279-281, 1980.

RESTREPO, A. M. & ARANGO, M. D. *In Vitro* susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to sulfonamides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 18, p. 190-194, 1980.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L.E. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infection Immunology*, v. 46, p. 346-353, 1984.

RICCI, G.; MOTA, F. T.; WAKAMATSU, A. et al. Canine paracoccidioidomycosis. *Medical Mycology*, v. 42, p. 379-383, 2004.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO, S. M. G.; THEODORO, R. C. et al. Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 636-646, 2009.

ROBBINS, N.; COLLINS, C.; MORHAYIM, J. et al. Metabolic of antifungal drug resistance. *Fungal Genetics and Biology*, 47: 81-93, 2010.

RUBIO, M. C.; GIL, J.; OCÁRIZ, I. R. et al. Comparison of results obtained by testing with three different agar media and by the NCCLS M27-A method for in vitro testing of fluconazole against *Candida* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 2665-2668, 2003.



SADDI, L. Caracterização fisiológica e molecular de *Leptomonas seymouri* resistentes ao trimetoprim, obtidas in vitro. Dissertação, Mestrado em Microbiologia, U.F.M.G., 1995.

SAIER JR. A functional-phylogenetic classification system for membrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 64, p. 354-411, 2000.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada a Experimentação Animal, 2ª Edição, FEPMVZ, Belo Horizonte, 2002.

SAN-BLAS, G. & NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia*, 165:183-195, 2008.

SAN-BLAS, G. & NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: CIHLAR, R.L. & CALDERONE, R.A. (Eds), Fungal pathogenesis: principles and clinical applications. Marcel Dekker, Inc, New York, 2001. 205 p.

SAN-BLAS, G. & SAN-BLAS, F. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. In: Paracoccidioidomycosis. FRANCO, M. LACAZ, C. S., RESTREPO, A. M. and DEL NEGRO, G. (Eds) Boca Raton: CRC Press, p. 49-66, 1994.

SAN-BLAS, G.; VEJA, G. N.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Medical Mycology*, v. 40, p. 225-242, 2002.

SANGLARD, D., COSTE, A. & FERRARI, S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *Yeast Research*, 9: 1029-1050, 2009.

SANTOS, D. A. & HAMDAN, J. S. Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (4): 1917-1920, 2005.

SHADOMY, S.; INGROFF, E. A.; CARTWRIGH, R. Y. Estudos de laboratório com agents antifúngicos: pruebas de susceptibilidade y bioensayos. In: LANETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W. J.; SHADOMY, H. J. (eds), *Manual de Microbiologia Clínica*, 4<sup>th</sup> edn. Buenos Aires: Editorial medica, Panamericana, p. 1229-1238, 1987.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES FILHO, F.Q.; MENDES, R.P. et al. Consenso em paracoccidioidomicose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.39, p. 297-310, 2006.

SILVA, S. S.; PAES, H. C.; SOARES, C. M. A. et al. Insights into the pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis* from transcriptome analysis-advances and perspectives. *Mycopathologia*, 165: 249-258, 2008.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; MADEIRA, M. et al. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, state of Minas Gerais, Brasil. *Medical Micology*, v. 36, p. 37-42, 1998.

SINGH, S. D.; ROBBINS, N.; ZAAS, A. K. et al. Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. *Plos Pathogens*, 5: 1000532, 2009.

SOARES, C. M. A.; MOLLINARI-MADLUN, E. E. W. I.; da SILVA, S. P. et al. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Journal clinical Microbiology*, v. 33, p. 505-507, 1995.

SOARES, D. A.; ANDRADE, R. V.; SIMONEIDE, S. S. et al. Extracellular *Paracoccidioides brasiliensis* phospholipase B involvement in alveolar macrophage interaction. *BMC Genomics*, 10 (241): 1-9, 2010.

STEVENS, D. A. & VO, P. T. Sinergistic interaction of Trimethoprim and sulfamethoxazole on *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 21(5): 852-854, 1982.

TEIXEIRA , M. M.; THEODORO, R. C.; CARVALHO, M. J. A. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52: 273-283, 2009.

TOLEDO, M.S.; LEVERY, S.B.; STRAUS, A.H. et al. Characterization of sphingolipids from mycopathogens: factors correlating with expression of 2-hydroxy fatty acyl (E)- $\Delta$ [3]-unsaturation in cerebrosides of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Aspergillus fumigatus*. *Biochemistry*, v. 38, p. 7294-7306, 1999.

TOMAZETTI, P. K.; CASTRO, N. S.; LENZI, H. L. et al. Response of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 to stressor agents and cell wall osmoregulators. *Fungal Biology*, v. 115, p. 62-69, 2011.

TORRES, I.; GARCÍA, A. M.; HERNANDEZ, O. et al. Presence and expression of the mating type locus in *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 47: 373-380, 2010).

TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. & COLOMBO, L. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. *Expert Rev. Anti. Infect. Therapy*, 6 (2): 251-262, 2008.

UNTEREINER, W. A.; NAVEAU, F. A.; SIGLER, L. et al. The Ajellomycetaceae: a new family of vertebrate-associated Onygenales. *Mycologia*, 96: 812-861, 2004.

VALLEJO, M. C.; MATSUO, A. L.; GANIKO, L. et al. The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic  $\alpha$ -galactosyl epitopes. *Eukaryotic Cell*, 10 (3): 343-351, 2011.

VISBAL, G.; SAN-BLAS, G.; MURGICH, J. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics. *Current Drug targets- Infections Disorders*, v.5 , p. 211-226, 2005.

WALMSLEY, M. I. B.; CHEN, D.; SHU, X. et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends in Microbiology*, v. 10, p. 80-85, 2002.

## **9. Anexos**

## **Anexo A:**

### **Meios de cultura utilizados nos ensaios de determinação da CIM**

### **Preparo de RPMI 1640**

- 10,4g de meio liofilizado- (Invitrogen);
- 34,53g de tampão MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico – 0,165 Molar-(Vetec);
- Água destilada para completar o volume de 1000 mL.

Os componentes do meio RPMI 1640 liofilizado (Invitrogen) encontram-se detalhados na tabela 2. O pH do meio foi acertado para 7,0 com NaOH 1N e esterilizado por filtração (membrana Millipore - 0,22 µm).

Para a confecção do ágar RPMI, esterilizou-se uma solução de caldo RPMI-1640 2 vezes concentrada por filtração e adicionou-se a uma solução de ágar 3%, pré-esterilizada por autoclavação (121°C, 15 minutos), resfriada para 55°C, volume a volume, distribuindo-se em placas de Petri (20 mL).

### **Preparo de Meio Mueller Hinton Modificado (MHM)**

- 21g de Mueller-Hinton (Himédia);
- 1% de glicose (Vetec);
- 1,5% de sulfato de amônio (Sigma);
- 0,001% de tiamina (Sigma);
- Água destilada para completar o volume para 1000 mL.

Todos os componentes, exceto a tiamina, foram homogeneizados e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. A solução de tiamina foi preparada separadamente, esterilizada por filtração (membrana Millipore - 0,22 µm) e adicionada posteriormente aos demais componentes do meio.

Tabela 2: Composição detalhada do meio RPMI 1640

| Constituinte             | g/L de água | Constituinte                         | g/L de água |
|--------------------------|-------------|--------------------------------------|-------------|
| L- arginina (base livre) | 0,200       | Biotina                              | 0,0002      |
| L-asparagina (anidra)    | 0,050       | D-pantotênico                        | 0,00025     |
| L-ácido aspártico        | 0,020       | Cloreto de colina                    | 0,003       |
| L-cistina . 2HCl         | 0,0652      | Ácido fólico                         | 0,001       |
| L-ácido glutâmico        | 0,020       | Mioinositol                          | 0,035       |
| L-glutamina              | 0,300       | Niacinamida                          | 0,001       |
| Glicina                  | 0,010       | PABA                                 | 0,001       |
| L-histidina (base livre) | 0,015       | Piridoxina HCl                       | 0,001       |
| L-hidroxirolina          | 0,020       | Riboflavina                          | 0,0002      |
| L-soleucina              | 0,050       | Tiamina HCl                          | 0,001       |
| L-leucina                | 0,050       | Vitamina B <sub>12</sub>             | 0,000005    |
| L-lisina . HCl           | 0,040       | Nitrato de cálcio x H <sub>2</sub> O | 0,100       |
| L-metionina              | 0,015       | Cloreto de potássio                  | 0,400       |
| L-fenilalanina           | 0,015       | Sulfato de magnésio (anidro)         | 0,04884     |
| L-prolina                | 0,020       | Cloreto de sódio                     | 6,000       |
| L-serina                 | 0,030       | Fosfato de sódio, dibásico (anidro)  | 0,800       |
| L-treonina               | 0,020       | D-glicose                            | 2,000       |
| L-triptofano             | 0,005       | Glutathione, reduzida                | 0,001       |
| L-tirosina . 2Na         | 0,02883     | Vermelho fenol, Na                   | 0,0053      |
| L-valina                 | 0,020       |                                      |             |

Legenda:

g/L \_ gramas por litro

### Preparo do Meio de McVeigh & Morton (MVM)

Os componentes necessários para a preparação do meio MVM encontram-se listados na tabela 3.

Todos os componentes com exceção do suplemento vitamínico e a solução de elementos traço foram homogeneizados em água destilada para um volume de 1000 mL, o pH foi ajustado para 7 com NaOH 1N e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

A solução de elementos traço foi preparada homogeneizando seus componentes em 100 mL de água destilada e esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos. O suplemento vitamínico foi preparado homogeneizando



seus componentes em 100 mL de água destilada e esterilizada por filtração (membrana Millipore - 0,22 µm).

Após a esterilização, a solução de elementos traço e a solução vitamínica foram adicionadas aos demais componentes do meio de cultura.

Tabela 3: Composição do meio MVM

| <b>Componentes</b>                              | <b>Qtde (1000 mL)</b> |
|---|-----------------------|
| Glicose   | 10 g                  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 1,5 g                 |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O           | 0,5 g                 |
| CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O           | 0,15 g                |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 2,0 g                 |
| L-Asparagina                                    | 2,0 g                 |
| L-Cisteína <sup>a</sup>                         | 0,2 g                 |
| Suplemento vitamínico <sup>b</sup>              | 10,0 mL               |
| Solução de elementos traço <sup>c</sup>         | 1,0 mL                |

<sup>a</sup> A cisteína foi dissolvida antes da adição dos demais componentes do meio em um pequeno volume de água destilada aquecida. Foi adicionado NaOH 1N até sua completa dissolução. Em seguida, os demais componentes do meio foram adicionados.

<sup>b</sup> A solução estoque de vitamina contém, por 100 mL: tiamina, 6,0 mg; niacina, 6,0 mg; pantotenato de cálcio, 0,1 mg; riboflavina, 1,0 mg; inositol, 1,0 mg; biotina, 0,1 mg; riboflavina, 1,0 mg; ácido fólico, 1,0 mg; cloreto de colina, 10 mg; e cloridrato de piridoxina, 10 mg.

<sup>c</sup> A solução de elementos traço contém, por 100 mL: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5,7 mg; CuSO<sub>4</sub> . 5H<sub>2</sub>O, 15,7 mg; Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 140,4 mg; MnSO<sub>4</sub>.14H<sub>2</sub>O, 8,1 mg; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, 3,6 mg; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 79,2 mg.

Todos os meios utilizados durante o ensaio de determinação de CIM foram mantidos sob congelamento (-20°C), descongelando-se uma única vez, momentos antes do uso.

## **Anexo B:**

### **Quantificação de células para inoculos em testes de determinação de CIM**

Tabela 5: Comparação entre quantificação espectrofotométrica (transmitância) e quantificação por contagem do número de células em câmara de Neubauer de amostras de *P. brasiliensis*

| <b>Amostras</b> | <b>Transmitância (%)</b> | <b>Contagem (céls/mL)</b> |
|-----------------|--------------------------|---------------------------|
| ED01            | 70,3                     | 1,94x 10 <sup>6</sup>     |
| 1578            | 70,8                     | 3,15x 10 <sup>6</sup>     |
| Pb01            | 70,9                     | 1,18x 10 <sup>6</sup>     |
| Pb4             | 70,5                     | 1,40x 10 <sup>6</sup>     |
| Pb2             | 70,8                     | 2,20x 10 <sup>6</sup>     |
| Pb5             | 70,2                     | 2,70x 10 <sup>6</sup>     |
| Utero           | 70,4                     | 1,60x 10 <sup>6</sup>     |
| Pb13            | 70,6                     | 1,60x 10 <sup>6</sup>     |
| Pb10            | 70,7                     | 1,45x 10 <sup>6</sup>     |
| Pb14            | 70,4                     | 2,70x 10 <sup>6</sup>     |
| Pb09            | 70,2                     | 2,20x 10 <sup>6</sup>     |
| Pinguim         | 70,1                     | 2,05x 10 <sup>6</sup>     |
| Pb9             | 70,5                     | 1,60x 10 <sup>6</sup>     |

## Anexo C:

Tabelas 7 a 13 correspondentes à  
apresentação dos resultados dos testes  
de determinação de CIM de cada droga  
para os 21 isolados de *P. brasiliensis*

Tabela 7: Determinação da CIM para Anfotericina B ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes condições experimentais

| Amostras          | RPMI   |        |        |        |        |        | MHM    |        |        |        |        |        | MVM    |        |        |     |        |        |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|--------|--------|
|                   | 37°C   |        |        | TA     |        |        | 37°C   |        |        | TA     |        |        | 37°C   |        |        | TA  |        |        |
|                   | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd | 10dd   | 15dd   |
| Ed01              | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 0,125  | 0,5    | 1,0    | 0,125  | 0,125  | 0,25   | 0,0078 | 0,0078 | 0,015  | 1,0    | 1,0    | 1,0    | (-) | 1,0    | 1,0    |
| 1578              | 0,5    | 0,5    | 0,5    | 0,062  | 0,25   | 1,0    | 0,015  | 0,125  | 0,125  | 0,0078 | 0,062  | 0,125  | (-)    | 0,0078 | 0,0078 | (-) | 0,25   | 1,0    |
| Pb01              | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,062  | 0,125  | 0,25   | 0,0078 | 0,062  | 0,25   | (-)    | (-)    | (-)    | (-) | (-)    | (-)    |
| Pb4               | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 0,25   | 0,5    | 0,5    | 0,015  | 0,015  | 0,125  | 0,0078 | 0,0078 | 0,031  | (-)    | 0,5    | 1,0    | (-) | 0,25   | 1,0    |
| Pb2               | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 1,0    | 0,062  | 0,062  | 0,125  | 0,0078 | 0,0078 | 0,015  | 0,0078 | 0,015  | 0,031  | (-) | 0,5    | 1,0    |
| Pb03              | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 0,25   | 0,25   | 1,0    | 0,25   | 0,5    | 1,0    | 0,0078 | 0,031  | 0,062  | (-)    | 0,5    | 0,5    | (-) | 1,0    | 1,0    |
| Pb6               | 0,25   | 1,0    | 1,0    | 0,031  | 0,25   | 1,0    | 0,125  | 0,125  | 0,25   | (-)    | 0,015  | 0,015  | 0,0078 | 0,031  | 0,062  | (-) | 0,031  | 0,031  |
| Pb5               | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 0,25   | 1,0    | 1,0    | 0,125  | 0,125  | 0,25   | 0,0078 | 0,062  | 0,125  | 0,031  | 0,062  | 0,125  | (-) | 0,25   | 1,0    |
| B339              | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 0,125  | 0,25   | 0,25   | 0,031  | 0,031  | 0,125  | 0,015  | 0,062  | 0,125  | 0,015  | 0,031  | 0,031  | (-) | 0,5    | 2,0    |
| Utero             | 0,25   | 1,0    | 1,0    | 0,062  | 0,25   | 1,0    | 0,125  | 0,125  | 0,25   | 0,0078 | 0,031  | 0,062  | 0,25   | 0,25   | 1,0    | (-) | 0,031  | 0,062  |
| Pb11              | 0,5    | 0,5    | 0,5    | (-)    | 0,25   | 0,5    | 0,125  | 0,125  | 0,25   | (-)    | 0,015  | 0,031  | (-)    | (-)    | 0,5    | (-) | 2,0    | 2,0    |
| Pb13              | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,062  | 1,0    | 1,0    | 0,062  | 0,125  | 0,125  | 0,0078 | 0,0078 | 0,031  | (-)    | 0,5    | 1      | (-) | 1,0    | 1,0    |
| Pb10              | 0,5    | 1,0    | 1,0    | 0,031  | 0,25   | 0,5    | 0,125  | 0,125  | 0,25   | (-)    | 0,031  | 0,031  | (-)    | 0,5    | 0,5    | (-) | 0,5    | 1,0    |
| Pb14              | 1,0    | 2,0    | 2,0    | 0,125  | 0,25   | 1,0    | 0,125  | 0,125  | 0,125  | 0,0078 | 0,031  | 0,031  | (-)    | 2,0    | 2,0    | (-) | 0,031  | 0,031  |
| 63265             | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 0,125  | 0,125  | 1,0    | 0,062  | 0,125  | 0,25   | 0,0078 | 0,031  | 0,062  | (-)    | (-)    | 0,5    | (-) | (-)    | 0,5    |
| Pb09              | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 0,125  | 0,25   | 0,25   | 0,062  | 0,125  | 0,25   | 0,062  | 0,125  | 0,25   | 0,062  | 0,062  | 0,062  | (-) | 0,5    | 0,5    |
| Pinguim           | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 0,062  | 0,25   | 0,25   | 0,125  | 0,125  | 0,25   | (-)    | 0,25   | 0,5    | 0,062  | 0,062  | 0,062  | (-) | 2,0    | 2,0    |
| Tatu              | 0,25   | 0,25   | 1,0    | 0,125  | 0,125  | 0,25   | 0,062  | 0,062  | 0,25   | (-)    | 0,015  | 0,031  | (-)    | 0,062  | 0,5    | (-) | 1,0    | 2,0    |
| Pb9               | 1,0    | 1,0    | 2,0    | 0,5    | 1,0    | 1,0    | 0,0078 | 0,125  | 0,25   | 0,015  | 0,031  | 0,062  | (-)    | (-)    | 1,0    | (-) | 1,0    | 2,0    |
| Pb8               | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 0,5    | 0,5    | 1,0    | 0,125  | 0,125  | 0,25   | 0,0078 | 0,0078 | 0,031  | (-)    | (-)    | (-)    | (-) | 0,5    | 2,0    |
| Pb18              | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 0,125  | 0,5    | 0,5    | 0,125  | 0,125  | 0,25   | 0,0078 | 0,0078 | 0,031  | 0,031  | 0,031  | 0,031  | (-) | 0,031  | 0,125  |
| CIM <sub>50</sub> | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 0,125  | 0,25   | 1,0    | 0,125  | 0,125  | 0,25   | 0,0078 | 0,031  | 0,031  | 1,0    | 0,5    | 0,5    | (*) | 0,5    | 1,0    |
| CIM <sub>90</sub> | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 0,25   | 1,0    | 1,0    | 0,125  | 0,125  | 0,25   | 0,062  | 0,062  | 0,25   | 1,0    | 2,0    | 2,0    | (*) | 2,0    | 2,0    |
| média geom.       | 0,6511 | 0,7937 | 0,8763 | 0,1291 | 0,3256 | 0,6300 | 0,0708 | 0,1057 | 0,2191 | 0,0096 | 0,0254 | 0,0542 | 0,0455 | 0,1190 | 0,2235 | (*) | 0,3466 | 0,6365 |

Legenda:

- dd \_ dias
- média geom. \_ média geométrica
- (-) \_ ausência de crescimento
- (\*) \_ não calculado
- TA\_ temperatura ambiente

Tabela 8: Determinação da CIM para Itraconazol ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes condições experimentais

| Amostras          | RPMI   |        |        |        |        |        | MHM    |        |        |        |        |        | MVM    |        |        |        |        |        |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                   | 37°C   |        |        | TA     |        |        | 37°C   |        |        | TA     |        |        | 37°C   |        |        | TA     |        |        |
|                   | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd    | 10dd   | 15dd   |
| Ed01              | 0,015  | 0,015  | 0,015  | 0,031  | 0,031  | 0,031  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,062  | 0,062  | 0,062  | (-)    | 0,0039 | 0,0039 |
| 1578              | 0,0078 | 0,031  | 0,031  | 0,031  | 0,031  | 0,062  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | (-)    | 0,0039 | 0,0039 | (-)    | 0,015  | 0,125  |
| Pb01              | 0,0078 | 0,0078 | 0,0078 | 0,0078 | 0,015  | 0,015  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | (-)    | (-)    | (-)    | (-)    | (-)    | (-)    |
| Pb4               | 0,062  | 0,062  | 0,062  | 0,125  | 0,125  | 0,125  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,125  | 0,125  | 0,125  | 0,25   | 0,25   | 0,25   | (-)    | 0,0078 | 0,031  |
| Pb2               | 0,0078 | 0,0078 | 0,0078 | 0,062  | 0,062  | 0,062  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0078 | (-)    | 0,0039 | 0,015  |
| Pb03              | 0,015  | 0,015  | 0,015  | 0,015  | 0,015  | 0,015  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,25   | 0,25   | 0,25   | (-)    | 0,0039 | 0,015  |
| Pb6               | 0,0078 | 0,0078 | 0,0078 | 0,062  | 0,062  | 0,062  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0078 | 0,0078 | 0,0078 | 0,125  | 0,125  | 0,125  |
| Pb5               | 0,015  | 0,015  | 0,015  | 0,031  | 0,031  | 0,031  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0078 | 0,0078 | 0,0078 | (-)    | 0,031  | 0,062  |
| B339              | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,062  | 0,062  | 0,062  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0078 | (-)    | 0,0039 | 0,031  |
| Utero             | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,062  | 0,062  | 0,062  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | (-)    | 0,0039 | 0,015  | 0,125  | 0,125  | 0,125  |
| Pb11              | 0,031  | 0,062  | 0,062  | 0,062  | 0,125  | 0,125  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | (-)    | 0,0039 | 0,015  | (-)    | 0,0039 | 0,0039 |
| Pb13              | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0078 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0078 | 0,0078 | 0,0078 | 0,015  | 0,015  | 0,015  | (-)    | 0,031  | 0,031  |
| Pb10              | 0,0078 | 0,0078 | 0,0078 | 0,062  | 0,062  | 0,125  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,031  | 0,062  | 0,062  | (-)    | 0,062  | 0,125  |
| Pb14              | 0,0078 | 0,0078 | 0,0078 | 0,125  | 0,125  | 0,125  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | (-)    | 0,0039 | 0,0039 | 0,125  | 0,125  | 0,125  |
| 63265             | 0,0078 | 0,0078 | 0,0078 | 0,031  | 0,062  | 0,062  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0078 | 0,015  | 0,031  | (-)    | 0,0039 | 0,0039 | (-)    | 0,031  | 0,062  |
| Pb09              | 0,031  | 0,031  | 0,062  | 0,0039 | 0,0039 | 0,031  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0078 | 0,0078 | 0,0078 | (-)    | 0,0039 | 0,0039 |
| Pinguim           | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,031  | 0,031  | 0,031  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0078 | 0,0078 | 0,0078 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0078 | (-)    | 0,031  | 0,062  |
| Tatu              | 0,0078 | 0,0078 | 0,0078 | 0,031  | 0,062  | 0,062  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | (-)    | 0,0039 | 0,0039 | (-)    | 0,0039 | 0,015  |
| Pb9               | 0,015  | 0,015  | 0,015  | 0,062  | 0,062  | 0,062  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0078 | 0,015  | 0,031  | (-)    | 0,0078 | 0,015  | (-)    | 0,0039 | 0,015  |
| Pb8               | 0,015  | 0,015  | 0,062  | 0,015  | 0,015  | 0,015  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | (-)    | (-)    | (-)    | (-)    | 0,031  | 0,125  |
| Pb18              | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,031  | 0,062  | 0,062  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,031  | 0,031  | 0,062  | 0,0078 | 0,0078 | 0,0078 | (-)    | 0,0078 | 0,015  |
| CIM <sub>50</sub> | 0,0078 | 0,0078 | 0,0078 | 0,031  | 0,062  | 0,062  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,25   | 0,0078 | 0,0078 | 0,125  | 0,15   | 0,031  |
| CIM <sub>90</sub> | 0,031  | 0,031  | 0,062  | 0,062  | 0,125  | 0,125  | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0078 | 0,015  | 0,031  | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,125  | 0,125  | 0,125  |
| média geom.       | 0,0097 | 0,0107 | 0,0119 | 0,0320 | 0,0377 | 0,0459 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0058 | 0,0062 | 0,0068 | 0,0165 | 0,0104 | 0,0139 | 0,1250 | 0,0145 | 0,0319 |

Legenda:

dd \_ dias

média geom. \_ média geométrica

(-) \_ ausência de crescimento

TA \_ temperatura ambiente

Tabela 9: Determinação da CIM para Cetoconazol ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes condições experimentais

| Amostras                | RPMI          |               |               |              |              |              | MHM           |               |               |               |               |               | MVM          |               |               |              |              |              |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
|                         | 37°C          |               |               | TA           |              |              | 37°C          |               |               | TA            |               |               | 37°C         |               |               | TA           |              |              |
|                         | 7dd           | 10dd          | 15dd          | 7dd          | 10dd         | 15dd         | 7dd           | 10dd          | 15dd          | 7dd           | 10dd          | 15dd          | 7dd          | 10dd          | 15dd          | 7dd          | 10dd         | 15dd         |
| Ed01                    | 0,0039        | 0,0039        | 0,0039        | 0,015        | 0,015        | 0,015        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0078       | 0,0078        | 0,015         | (-)          | 0,0019       | 0,015        |
| 1578                    | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0078       | 0,015        | 0,015        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | (-)          | 0,0019        | 0,0019        | (-)          | 0,015        | 0,015        |
| Pb01                    | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | (-)          | 0,125        | 0,125        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | (-)          | (-)           | (-)           | (-)          | (-)          | (-)          |
| Pb4                     | 0,015         | 0,015         | 0,031         | 0,062        | 0,062        | 0,062        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0078        | 0,0078        | 0,0078        | 0,031        | 0,031         | 0,031         | (-)          | 0,0078       | 0,015        |
| Pb2                     | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,015        | 0,031        | 0,031        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019       | 0,0039        | 0,0039        | (-)          | 0,0039       | 0,031        |
| Pb03                    | 0,015         | 0,015         | 0,015         | 0,0039       | 0,0039       | 0,0078       | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,015        | 0,015         | 0,031         | (-)          | 0,0039       | 0,015        |
| Pb6                     | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,031        | 0,031        | 0,062        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | (-)           | 0,0019        | 0,0019        | 0,0078       | 0,0078        | 0,0078        | 0,062        | 0,062        | 0,062        |
| Pb5                     | 0,0039        | 0,0039        | 0,0078        | 0,015        | 0,015        | 0,015        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0039       | 0,0039        | 0,0039        | (-)          | 0,015        | 0,062        |
| B339                    | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,125        | 2,0          | 2,0          | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0039        | 0,0078       | 0,0078        | 0,0078        | (-)          | 0,031        | 0,062        |
| Utero                   | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,031        | 0,031        | 0,062        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | (-)          | 0,0078        | 0,0078        | 0,062        | 0,062        | 0,062        |
| Pb11                    | 0,015         | 0,031         | 0,031         | (-)          | 0,25         | 0,25         | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | (-)           | 0,0019        | 0,0019        | (-)          | 0,0078        | 0,0078        | (-)          | 0,031        | 0,062        |
| Pb13                    | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019       | 0,0019       | 0,0078       | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0039       | 0,0039        | 0,0039        | (-)          | 0,031        | 0,062        |
| Pb10                    | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,031        | 0,062        | 0,062        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | (-)           | 0,0019        | 0,0019        | 0,0078       | 0,0078        | 0,0078        | (-)          | 0,031        | 0,031        |
| Pb14                    | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,031        | 0,031        | 0,031        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | (-)          | 0,0019        | 0,0019        | 0,062        | 0,062        | 0,062        |
| 63265                   | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,015        | 0,015        | 0,015        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | (-)          | 0,0039        | 0,0039        | (-)          | 0,0019       | 0,062        |
| Pb09                    | 0,0039        | 0,0039        | 0,0039        | 0,031        | 0,031        | 0,031        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0078       | 0,0078        | 0,0078        | (-)          | 0,015        | 0,031        |
| Pinguim                 | 0,0078        | 0,0078        | 0,0078        | 0,0039       | 0,0078       | 0,0078       | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0039        | 0,0039        | 0,0078        | 0,0078       | 0,0078        | 0,0078        | (-)          | 0,062        | 0,062        |
| Tatu                    | 0,0019        | 0,015         | 0,015         | 0,125        | 0,25         | 0,25         | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | (-)           | 0,0019        | 0,0019        | (-)          | 0,0019        | 0,0039        | (-)          | 0,031        | 0,031        |
| Pb9                     | 0,0039        | 0,0039        | 0,0039        | 0,031        | 0,031        | 0,031        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | (-)          | 0,0039        | 0,0039        | (-)          | 0,031        | 0,062        |
| Pb8                     | 0,0039        | 0,0039        | 0,0039        | 0,0039       | 0,0039       | 0,0039       | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | (-)          | (-)           | (-)           | (-)          | 0,0039       | 0,031        |
| Pb18                    | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,25         | 0,25         | 0,25         | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0078       | 0,0078        | 0,0078        | (-)          | 0,0039       | 0,0078       |
| <b>CIM<sub>50</sub></b> | <b>0,0019</b> | <b>0,0019</b> | <b>0,0019</b> | <b>0,031</b> | <b>0,031</b> | <b>0,031</b> | <b>0,0019</b> | <b>0,0019</b> | <b>0,0019</b> | <b>0,0019</b> | <b>0,0019</b> | <b>0,0019</b> | <b>0,015</b> | <b>0,0078</b> | <b>0,0078</b> | <b>0,062</b> | <b>0,031</b> | <b>0,062</b> |
| <b>CIM<sub>90</sub></b> | <b>0,015</b>  | <b>0,015</b>  | <b>0,015</b>  | <b>0,25</b>  | <b>0,25</b>  | <b>0,25</b>  | <b>0,0019</b> | <b>0,0019</b> | <b>0,0019</b> | <b>0,0078</b> | <b>0,0019</b> | <b>0,0039</b> | <b>0,031</b> | <b>0,031</b>  | <b>0,031</b>  | <b>0,062</b> | <b>0,062</b> | <b>0,062</b> |
| média geom.             | 0,0032        | 0,0037        | 0,0040        | 0,0206       | 0,0341       | 0,0402       | 0,0019        | 0,0019        | 0,0019        | 0,0022        | 0,0021        | 0,0022        | 0,0073       | 0,0058        | 0,0065        | 0,0620       | 0,0149       | 0,0354       |

Legenda:

dd \_ dias

média geom. \_ média geométrica

(-) \_ ausência de crescimento

TA \_ temperatura ambiente

Tabela 10: Determinação da CIM para Fluconazol ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes condições experimentais

| Amostras          | RPMI   |        |        |        |        |        | MHM    |        |        |        |        |        | MVM    |        |        |        |        |        |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                   | 37°C   |        |        | TA     |        |        | 37°C   |        |        | TA     |        |        | 37°C   |        |        | TA     |        |        |
|                   | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd    | 10dd   | 15dd   |
| Ed01              | 1,0    | 1,0    | 2,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 0,125  | 0,125  | 0,25   | 0,125  | 0,125  | 0,125  | 0,5    | 0,5    | 1,0    | (-)    | 0,062  | 0,125  |
| 1578              | 0,25   | 0,5    | 0,5    | 1,0    | 2,0    | 2,0    | 0,25   | 0,5    | 0,5    | 0,25   | 0,25   | 0,5    | (-)    | 0,0078 | 0,0078 | (-)    | 0,031  | 0,062  |
| Pb01              | 0,25   | 0,25   | 0,5    | 0,5    | 0,5    | 0,5    | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,125  | 0,25   | 0,25   | (-)    | (-)    | (-)    | (-)    | (-)    | (-)    |
| Pb4               | 8,0    | 8,0    | 8,0    | 8,0    | 8,0    | 8,0    | 0,5    | 0,5    | 1,0    | 2,0    | 2,0    | 2,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | (-)    | 0,015  | 0,031  |
| Pb2               | 0,5    | 0,5    | 0,5    | 2,0    | 2,0    | 2,0    | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,062  | 0,25   | 0,5    | (-)    | 0,062  | 0,25   |
| Pb03              | 2,0    | 2,0    | 2,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 0,5    | 1,0    | 1,0    | 0,062  | 0,062  | 0,062  | 2,0    | 2,0    | 2,0    | (-)    | 0,031  | 0,062  |
| Pb6               | 0,5    | 0,5    | 0,5    | 2,0    | 2,0    | 2,0    | 0,125  | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 2,0    | 2,0    |
| Pb5               | 0,5    | 0,5    | 1,0    | 2,0    | 2,0    | 2,0    | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,125  | 0,125  | 0,125  | 1,0    | 1,0    | 1,0    | (-)    | 0,015  | 0,5    |
| B339              | 0,5    | 0,5    | 0,5    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 2,0    | 2,0    | 2,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | (-)    | 0,125  | 0,5    |
| Utero             | 0,25   | 0,5    | 0,5    | 2,0    | 2,0    | 2,0    | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,062  | 0,062  | 0,125  | (-)    | 0,125  | 0,125  | 4,0    | 4,0    | 4,0    |
| Pb11              | 2,0    | 4,0    | 8,0    | 4,0    | 4,0    | 8,0    | 0,5    | 0,5    | 0,5    | 0,25   | 0,25   | 0,25   | (-)    | 0,5    | 0,5    | (-)    | 0,015  | 0,031  |
| Pb13              | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,5    | 1,0    | 1,0    | 0,125  | 0,125  | 0,125  | 0,125  | 0,125  | 0,25   | 0,5    | 0,5    | 0,5    | (-)    | 0,015  | 0,125  |
| Pb10              | 1,0    | 1,0    | 2,0    | 1,0    | 4,0    | 8,0    | 0,125  | 0,125  | 0,125  | 0,5    | 0,5    | 0,5    | 0,5    | 0,5    | 0,5    | (-)    | 0,062  | 0,25   |
| Pb14              | 0,25   | 0,5    | 0,5    | 4,0    | 4,0    | 4,0    | 0,125  | 0,125  | 0,125  | 0,125  | 0,125  | 0,125  | 4      | 0,25   | 0,25   | (-)    | 4,0    | 4,0    |
| 63265             | 0,5    | 0,5    | 0,5    | 1,0    | 2,0    | 2,0    | 0,125  | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,5    | 0,5    | (-)    | 0,25   | 0,25   | (-)    | 0,062  | 0,5    |
| Pb09              | 0,5    | 0,5    | 1,0    | 1,0    | 2,0    | 2,0    | 0,25   | 0,5    | 0,5    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | (-)    | 0,062  | 0,062  |
| Pinguim           | 2,0    | 2,0    | 2,0    | 2,0    | 2,0    | 2,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 2,0    | 2,0    | 2,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | (-)    | 0,062  | 0,125  |
| Tatu              | 0,5    | 0,5    | 1,0    | 2,0    | 2,0    | 2,0    | 0,125  | 0,125  | 0,125  | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,25   | (-)    | 0,031  | 0,062  |
| Pb9               | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 4,0    | 4,0    | 4,0    | 0,062  | 0,062  | 0,062  | 0,25   | 0,5    | 0,5    | (-)    | 0,125  | 0,25   | (-)    | 0,125  | 0,5    |
| Pb8               | 0,5    | 0,5    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,031  | 0,031  | 0,062  | (-)    | (-)    | (-)    | (-)    | 0,062  | 0,5    |
| Pb18              | 0,125  | 0,125  | 0,25   | 1,0    | 2,0    | 2,0    | 0,125  | 0,25   | 0,25   | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | 1,0    | (-)    | 0,125  | 0,5    |
| CIM <sub>50</sub> | 0,5    | 0,5    | 1,0    | 1,0    | 2,0    | 2,0    | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 0,25   | 1,0    | 0,5    | 1,0    | 4,0    | 0,062  | 0,25   |
| CIM <sub>90</sub> | 2,0    | 2,0    | 2,0    | 4,0    | 4,0    | 8,0    | 0,5    | 1,0    | 1,0    | 2,0    | 2,0    | 2,0    | 4,0    | 2,0    | 2,0    | 4,0    | 4,0    | 4,0    |
| média geom.       | 0,6095 | 0,6955 | 0,9361 | 1,5359 | 1,9351 | 2,0671 | 0,2263 | 0,2759 | 0,2947 | 0,2668 | 0,2945 | 0,3362 | 0,7426 | 0,4166 | 0,4648 | 2,0000 | 0,0843 | 0,2494 |

Legenda:

dd \_ dias

média geom. \_ média geométrica

(-) \_ ausência de crescimento

TA \_ temperatura ambiente



Tabela 11: Determinação da CIM para Sulfametoxazol ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes condições experimentais

| Amostras          | RPMI   |        |       |        |       |       | MHM   |       |       |        |        |        | MVM   |       |       |      |       |       |
|-------------------|--------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
|                   | 37°C   |        |       | TA     |       |       | 37°C  |       |       | TA     |        |        | 37°C  |       |       | TA   |       |       |
|                   | 7dd    | 10dd   | 15dd  | 7dd    | 10dd  | 15dd  | 7dd   | 10dd  | 15dd  | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd   | 10dd  | 15dd  | 7dd  | 10dd  | 15dd  |
| Ed01              | 150    | 150    | 300   | 300    | 300   | 300   | 75    | 75    | 75    | 37,5   | 37,5   | 37,5   | 1,17  | 1,17  | 2,34  | (-)  | 9,37  | 9,37  |
| 1578              | 150    | 150    | 300   | 150    | 150   | 300   | 37,5  | 37,5  | 37,5  | 150    | 150    | 150    | (-)   | 1,17  | 1,17  | (-)  | 2,34  | 9,37  |
| Pb01              | 150    | 150    | 150   | 150    | 150   | 300   | 75    | 75    | 75    | 75     | 75     | 75     | (-)   | (-)   | (-)   | (-)  | (-)   | (-)   |
| Pb4               | 300    | 300    | 300   | 300    | 300   | 300   | 150   | 150   | 150   | 150    | 300    | 300    | 9,37  | 4,68  | 4,68  | (-)  | 2,34  | 4,68  |
| Pb2               | 150    | 150    | 150   | 300    | 300   | 300   | 150   | 150   | 150   | 150    | 150    | 150    | 1,17  | 2,34  | 2,34  | (-)  | 1,17  | 4,68  |
| Pb03              | 150    | 150    | 300   | 300    | 300   | 300   | 150   | 150   | 150   | 150    | 150    | 150    | 2,34  | 2,34  | 4,68  | (-)  | 4,68  | 9,37  |
| Pb6               | 150    | 150    | 300   | 75     | 300   | 300   | 75    | 75    | 75    | 150    | 150    | 150    | 1,17  | 4,68  | 4,68  | 2,34 | 37,5  | 37,5  |
| Pb5               | 150    | 150    | 300   | 300    | 300   | 300   | 75    | 75    | 75    | 150    | 150    | 300    | 18,75 | 18,75 | 18,75 | (-)  | 4,68  | 18,75 |
| B339              | 150    | 150    | 300   | 75     | 75    | 300   | 150   | 150   | 150   | 75     | 75     | 75     | 9,37  | 9,37  | 9,37  | (-)  | 1,17  | 1,17  |
| Utero             | 150    | 150    | 300   | 75     | 300   | 300   | 75    | 75    | 75    | 150    | 150    | 150    | (-)   | 1,17  | 1,17  | (-)  | 37,5  | 37,5  |
| Pb11              | 150    | 150    | 150   | 150    | 150   | 300   | 9,37  | 9,37  | 9,37  | 9,37   | 18,75  | 37,5   | (-)   | 1,17  | 1,17  | (-)  | 2,34  | 4,68  |
| Pb13              | 75     | 75     | 150   | 150    | 300   | 300   | 75    | 75    | 75    | 150    | 300    | 300    | 2,34  | 2,34  | 4,68  | (-)  | 4,68  | 9,37  |
| Pb10              | 150    | 150    | 150   | 150    | 300   | 300   | 75    | 75    | 75    | 75     | 75     | 150    | 2,34  | 2,34  | 2,34  | (-)  | 4,68  | 9,37  |
| Pb14              | 150    | 150    | 300   | 150    | 300   | 300   | 75    | 75    | 150   | 150    | 150    | 150    | 9,37  | 4,68  | 4,68  | (-)  | 37,5  | 37,5  |
| 63265             | 150    | 150    | 300   | 150    | 300   | 300   | 37,5  | 37,5  | 37,5  | 150    | 150    | 150    | (-)   | 1,17  | 1,17  | (-)  | 1,17  | 1,17  |
| Pb09              | 150    | 150    | 300   | 300    | 300   | 300   | 150   | 150   | 150   | 150    | 150    | 150    | 18,75 | 18,75 | 18,75 | (-)  | 4,68  | 4,68  |
| Pinguim           | 300    | 300    | 300   | 150    | 300   | 300   | 150   | 150   | 150   | 150    | 150    | 150    | 18,75 | 18,75 | 18,75 | (-)  | 1,17  | 1,17  |
| Tatu              | 150    | 150    | 300   | 150    | 300   | 300   | 75    | 75    | 75    | 150    | 150    | 150    | 1,17  | 1,17  | 2,34  | (-)  | 4,68  | 9,37  |
| Pb9               | 300    | 300    | 300   | 150    | 300   | 300   | 75    | 75    | 75    | 150    | 150    | 150    | (-)   | 1,17  | 1,17  | (-)  | 9,37  | 9,37  |
| Pb8               | 150    | 150    | 300   | 150    | 300   | 300   | 75    | 75    | 75    | 150    | 300    | 300    | (-)   | (-)   | (-)   | (-)  | 1,17  | 4,68  |
| Pb18              | 300    | 300    | 300   | 150    | 150   | 300   | 75    | 150   | 150   | 75     | 75     | 150    | 18,75 | 18,75 | 18,75 | (-)  | 1,17  | 1,17  |
| CIM <sub>50</sub> | 150,0  | 150,0  | 300,0 | 150,0  | 300,0 | 300,0 | 75,0  | 75,0  | 75,0  | 150,0  | 150,0  | 150,0  | 18,75 | 2,34  | 4,68  | 2,34 | 4,68  | 9,37  |
| CIM <sub>90</sub> | 300,0  | 300,0  | 300,0 | 300,0  | 300,0 | 300,0 | 150,0 | 150,0 | 150,0 | 150,0  | 300,0  | 300,0  | 18,75 | 18,75 | 18,75 | 2,34 | 37,5  | 37,5  |
| média geom.       | 165,61 | 165,61 | 246,1 | 165,61 | 246,1 | 300,0 | 77,51 | 80,12 | 82,80 | 107,83 | 123,05 | 140,42 | 4,683 | 3,372 | 3,901 | (*)  | 4,076 | 6,623 |

Legenda:

dd \_ dias

média geom. \_ média geométrica

(-) \_ ausência de crescimento

(\*) \_ não calculado

TA \_ temperatura ambiente

Tabela12: Determinação da CIM para Bactrim® (µg/mL) em diferentes condições experimentais

| Amostras          | RPMI   |        |        |        |        |       | MHM   |       |       |        |        |       | MVM    |        |        |        |        |        |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                   | 37°C   |        |        | TA     |        |       | 37°C  |       |       | TA     |        |       | 37°C   |        |        | TA     |        |        |
|                   | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd    | 10dd   | 15dd  | 7dd   | 10dd  | 15dd  | 7dd    | 10dd   | 15dd  | 7dd    | 10dd   | 15dd   | 7dd    | 10dd   | 15dd   |
| Ed01              | 150    | 150    | 300    | 300    | 300    | 300   | 150   | 150   | 150   | 75     | 75     | 75    | 1,17   | 1,17   | 4,68   | (-)    | 1,17   | 1,17   |
| 1578              | 18,75  | 37,5   | 75     | 150    | 150    | 300   | 18,75 | 37,5  | 37,5  | 75     | 75     | 150   | (-)    | 1,17   | 1,17   | (-)    | 1,17   | 4,68   |
| Pb01              | 75     | 150    | 150    | 150    | 150    | 300   | 75    | 75    | 75    | 75     | 75     | 75    | (-)    | (-)    | (-)    | (-)    | (-)    | (-)    |
| Pb4               | 300    | 300    | 300    | 150    | 150    | 300   | 75    | 75    | 150   | 150    | 300    | 300   | 4,68   | 4,68   | 4,68   | (-)    | 1,17   | 2,34   |
| Pb2               | 75     | 75     | 150    | 300    | 300    | 300   | 75    | 75    | 75    | 150    | 150    | 150   | 1,17   | 1,17   | 4,68   | (-)    | 2,34   | 9,37   |
| Pb03              | 150    | 150    | 300    | 300    | 300    | 300   | 150   | 150   | 300   | 300    | 300    | 300   | 4,68   | 4,68   | 9,37   | (-)    | 4,68   | 18,75  |
| Pb6               | 150    | 150    | 300    | 300    | 300    | 300   | 150   | 150   | 150   | 150    | 150    | 150   | 1,17   | 2,34   | 2,34   | 9,37   | 9,37   | 9,37   |
| Pb5               | 150    | 150    | 300    | 300    | 300    | 300   | 75    | 75    | 75    | 300    | 300    | 300   | 9,37   | 9,37   | 9,37   | (-)    | 1,17   | 9,37   |
| B339              | 75     | 150    | 300    | 75     | 150    | 300   | 150   | 150   | 150   | 75     | 75     | 75    | 9,37   | 9,37   | 9,37   | (-)    | 4,68   | 18,75  |
| Utero             | 150    | 150    | 150    | 300    | 300    | 300   | 75    | 75    | 75    | 300    | 300    | 300   | (-)    | 1,17   | 1,17   | 18,75  | 75     | 75     |
| Pb11              | 150    | 150    | 150    | 150    | 150    | 300   | 18,75 | 18,75 | 18,75 | 18,75  | 18,75  | 75    | (-)    | 1,17   | 1,17   | (-)    | 1,17   | 2,34   |
| Pb13              | 150    | 150    | 300    | 150    | 150    | 300   | 150   | 150   | 150   | 150    | 300    | 300   | 2,34   | 2,34   | 4,68   | (-)    | 4,68   | 4,68   |
| Pb10              | 150    | 150    | 150    | 300    | 300    | 300   | 75    | 75    | 75    | 75     | 75     | 75    | 4,68   | 4,68   | 4,68   | (-)    | 4,68   | 9,37   |
| Pb14              | 75     | 150    | 150    | 150    | 300    | 300   | 150   | 150   | 150   | 150    | 150    | 150   | 4,68   | 4,68   | 4,68   | (-)    | 75     | 75     |
| 63265             | 75     | 150    | 150    | 150    | 300    | 300   | 75    | 75    | 75    | 150    | 150    | 150   | (-)    | 1,17   | 1,17   | (-)    | 1,17   | 1,17   |
| Pb09              | 150    | 150    | 300    | 300    | 300    | 300   | 300   | 300   | 300   | 150    | 150    | 150   | 9,37   | 9,37   | 9,37   | (-)    | 4,68   | 9,37   |
| Pinguim           | 150    | 150    | 150    | 150    | 300    | 300   | 75    | 75    | 150   | 150    | 150    | 150   | 18,75  | 18,75  | 18,75  | (-)    | 4,68   | 4,68   |
| Tatu              | 150    | 150    | 300    | 150    | 300    | 300   | 75    | 75    | 75    | 150    | 150    | 150   | 1,17   | 1,17   | 4,68   | (-)    | 9,37   | 9,37   |
| Pb9               | 75     | 75     | 150    | 150    | 300    | 300   | 37,5  | 37,5  | 37,5  | 150    | 150    | 150   | (-)    | (-)    | 2,34   | (-)    | 1,17   | 2,34   |
| Pb8               | 150    | 150    | 150    | 300    | 300    | 300   | 75    | 75    | 75    | 75     | 150    | 150   | (-)    | (-)    | (-)    | (-)    | 2,34   | 4,68   |
| Pb18              | 150    | 150    | 150    | 150    | 150    | 300   | 150   | 150   | 150   | 150    | 150    | 150   | 4,68   | 4,68   | 4,68   | (-)    | 1,17   | 1,17   |
| CIM <sub>50</sub> | 150,0  | 150,0  | 150,0  | 150,0  | 300,0  | 300,0 | 75,0  | 75,0  | 75,0  | 150,0  | 150,0  | 150,0 | 9,37   | 4,68   | 4,68   | 18,75  | 4,68   | 9,37   |
| CIM <sub>90</sub> | 150,0  | 150,0  | 300,0  | 300,0  | 300,0  | 300,0 | 150,0 | 150,0 | 150,0 | 300,0  | 300,0  | 300,0 | 18,75  | 18,75  | 18,75  | 18,75  | 75,0   | 75,0   |
| média geom.       | 115,19 | 135,86 | 195,33 | 195,33 | 238,11 | 300,0 | 85,59 | 88,46 | 97,67 | 123,05 | 135,86 | 150,0 | 3,8405 | 3,0648 | 4,0458 | 13,255 | 3,5477 | 6,3972 |

Legenda:

- dd \_ dias
- média geom. \_ média geométrica
- (-) \_ ausência de crescimento
- TA \_ temperatura ambiente

Tabela 13: Determinação da CIM para Terbinafina ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes condições experimentais

| Amostras                | RPMI         |              |             |             |            |            | MHM          |              |              |              |              |              | MVM        |            |            |            |              |              |
|-------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|------------|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------|------------|------------|------------|--------------|--------------|
|                         | 37°C         |              |             | TA          |            |            | 37°C         |              |              | TA           |              |              | 37°C       |            |            | TA         |              |              |
|                         | 7dd          | 10dd         | 15dd        | 7dd         | 10dd       | 15dd       | 7dd          | 10dd         | 15dd         | 7dd          | 10dd         | 15dd         | 7dd        | 10dd       | 15dd       | 7dd        | 10dd         | 15dd         |
| Ed01                    | 0,125        | 0,125        | 0,25        | 0,0078      | 0,015      | 0,015      | 0,0078       | 0,0078       | 0,0078       | 0,0078       | 0,031        | 0,062        | 0,031      | 0,031      | 0,25       | (-)        | 0,015        | 0,062        |
| 1578                    | 0,062        | 0,125        | 0,25        | 0,25        | 1,0        | 1,0        | 0,25         | 0,25         | 0,25         | 0,125        | 0,125        | 0,125        | (-)        | 0,0078     | 0,0078     | (-)        | 0,0078       | 0,031        |
| Pb01                    | 0,062        | 0,062        | 0,125       | 0,062       | 0,25       | 0,25       | 0,0078       | 0,0078       | 0,015        | 0,0078       | 0,062        | 0,062        | (-)        | (-)        | (-)        | (-)        | (-)          | (-)          |
| Pb4                     | 0,25         | 0,25         | 0,5         | 1,0         | 1,0        | 1,0        | 0,062        | 0,125        | 0,125        | 0,25         | 0,25         | 0,25         | 0,25       | 1,0        | 1,0        | (-)        | 0,031        | 0,125        |
| Pb2                     | 0,25         | 0,25         | 0,5         | 0,5         | 0,5        | 1,0        | 0,015        | 0,015        | 0,015        | 0,062        | 0,062        | 0,062        | 0,25       | 0,25       | 0,5        | (-)        | 0,015        | 0,031        |
| Pb03                    | 0,25         | 0,25         | 0,5         | 0,0078      | 0,0078     | 0,0078     | 0,031        | 0,062        | 0,062        | 0,062        | 0,062        | 0,062        | 0,5        | 0,5        | 1,0        | (-)        | 0,031        | 0,031        |
| Pb6                     | 0,125        | 0,125        | 0,25        | 0,5         | 1,0        | 2,0        | 0,0078       | 0,0078       | 0,015        | 0,0078       | 0,062        | 0,062        | 0,25       | 0,5        | 0,5        | 0,062      | 1,0          | 1,0          |
| Pb5                     | 0,25         | 0,25         | 0,5         | 0,031       | 0,031      | 0,031      | 0,015        | 0,031        | 0,031        | 0,125        | 0,125        | 0,25         | 0,5        | 0,5        | 0,5        | (-)        | 0,015        | 0,062        |
| B339                    | 0,125        | 0,125        | 0,25        | 2,0         | 2,0        | 2,0        | 0,015        | 0,015        | 0,031        | 0,062        | 0,125        | 0,125        | 0,5        | 0,5        | 0,5        | (-)        | 0,062        | 0,125        |
| Utero                   | 0,125        | 0,125        | 0,25        | 0,5         | 1,0        | 2,0        | 0,0078       | 0,0078       | 0,015        | 0,062        | 0,062        | 0,062        | (-)        | 0,125      | 0,125      | 1,0        | 1,0          | 1,0          |
| Pb11                    | 0,25         | 0,25         | 0,5         | 0,25        | 1,0        | 1,0        | 0,015        | 0,031        | 0,031        | 0,0078       | 0,062        | 0,062        | (-)        | 0,5        | 0,5        | (-)        | 0,031        | 0,062        |
| Pb13                    | 0,125        | 0,125        | 0,25        | 0,25        | 0,5        | 1,0        | 0,015        | 0,015        | 0,015        | 0,125        | 0,125        | 0,25         | 0,5        | 0,5        | 1,0        | (-)        | 0,062        | 0,125        |
| Pb10                    | 0,125        | 0,125        | 0,5         | 0,5         | 1,0        | 2,0        | 0,015        | 0,015        | 0,015        | 0,0078       | 0,062        | 0,062        | 0,5        | 0,5        | 0,5        | (-)        | 0,0078       | 0,062        |
| Pb14                    | 0,125        | 0,125        | 0,25        | 0,062       | 0,062      | 0,062      | 0,015        | 0,015        | 0,015        | 0,25         | 0,25         | 0,25         | 0,5        | 1,0        | 1,0        | 2,0        | 2,0          | 2,0          |
| 63265                   | 0,031        | 0,062        | 0,125       | 0,125       | 0,25       | 0,5        | 0,0078       | 0,015        | 0,015        | 0,062        | 0,125        | 0,125        | (-)        | 0,25       | 0,25       | (-)        | 0,125        | 1,0          |
| Pb09                    | 0,25         | 0,25         | 0,5         | 0,0078      | 0,015      | 0,015      | 0,0078       | 0,015        | 0,015        | 0,25         | 0,5          | 0,5          | 1,0        | 1,0        | 1,0        | (-)        | 0,0078       | 0,031        |
| Pinguim                 | 0,5          | 0,5          | 0,5         | 1,0         | 1,0        | 2,0        | 0,125        | 0,125        | 0,125        | 1,0          | 1,0          | 1,0          | 0,5        | 0,5        | 0,5        | (-)        | 0,062        | 0,125        |
| Tatu                    | 0,125        | 0,125        | 0,25        | 0,25        | 0,5        | 0,5        | 0,0078       | 0,0078       | 0,0078       | 0,0078       | 0,062        | 0,062        | 0,25       | 0,25       | 0,5        | (-)        | 0,0078       | 0,031        |
| Pb9                     | 0,125        | 0,125        | 0,25        | 1,0         | 1,0        | 1,0        | 0,25         | 0,25         | 0,25         | 0,125        | 0,25         | 0,25         | 0,25       | 0,25       | 0,5        | (-)        | 0,062        | 0,062        |
| Pb8                     | 0,25         | 0,25         | 0,5         | 0,25        | 0,5        | 0,5        | 0,015        | 0,031        | 0,031        | 0,0078       | 0,0078       | 0,125        | (-)        | (-)        | (-)        | (-)        | 0,062        | 0,062        |
| Pb18                    | 0,125        | 0,25         | 0,25        | 4,0         | 4,0        | 4,0        | 0,015        | 0,015        | 0,031        | 0,125        | 0,125        | 0,25         | 0,5        | 0,5        | 1,0        | (-)        | 0,125        | 1,0          |
| <b>CIM<sub>50</sub></b> | <b>0,125</b> | <b>0,125</b> | <b>0,25</b> | <b>0,25</b> | <b>0,5</b> | <b>1,0</b> | <b>0,015</b> | <b>0,015</b> | <b>0,015</b> | <b>0,062</b> | <b>0,125</b> | <b>0,125</b> | <b>0,5</b> | <b>0,5</b> | <b>0,5</b> | <b>2,0</b> | <b>0,062</b> | <b>0,062</b> |
| <b>CIM<sub>90</sub></b> | <b>0,25</b>  | <b>0,25</b>  | <b>0,5</b>  | <b>1,0</b>  | <b>1,0</b> | <b>2,0</b> | <b>0,125</b> | <b>0,125</b> | <b>0,125</b> | <b>0,25</b>  | <b>0,25</b>  | <b>0,25</b>  | <b>1,0</b> | <b>1,0</b> | <b>1,0</b> | <b>2,0</b> | <b>1,0</b>   | <b>1,0</b>   |
| média geom.             | 0,1473       | 0,1627       | 0,3150      | 0,2048      | 0,3349     | 0,4219     | 0,0193       | 0,0244       | 0,0287       | 0,0511       | 0,1022       | 0,1331       | 0,3453     | 0,3110     | 0,4321     | 0,4987     | 0,0503       | 0,1244       |

Legenda:

dd \_ dias

média geom. \_ média geométrica

(-) \_ ausência de crescimento

TA \_ temperatura ambiente

**Anexo D:  
Análise Estatística**

Tabela 14: Tratamento estatístico dos valores de CIM para Anfotericina B em diferentes condições experimentais

| ANÁLISE FRIEDMAN  |                   |           |                |         | ANÁLISE WILCOXON |           |           |           |           |         |
|-------------------|-------------------|-----------|----------------|---------|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|
| Temperatura       | Meio/Leitura      | Resultado | Valor Friedman | Valor P | Temperatura      | Meio      | Leitura   | Resultado | Valor P   |         |
| 37°C              | RPMI<br>7/10/15dd | diferente | 9,33           | 0,0094  | 37°C             | RPMI      | 7 x 10dd  | sem #     | 0,125     |         |
|                   | MHM<br>7/10/15dd  | diferente | 30,55          | <0,0001 |                  |           | 10 x 15dd | sem #     | 0,5       |         |
|                   | MVM<br>7/10/15dd  | diferente | 25,53          | <0,0001 |                  |           | 7 x 15dd  | diferente | 0,0313    |         |
| 37°C<br>x<br>37°C | RPMI<br>x<br>MHM  | diferente | 97,13          | <0,0001 |                  | MHM       | 7 x 10dd  | sem #     | 0,1484    |         |
|                   | RPMI<br>x<br>MVM  | diferente | 69,91          | <0,0001 |                  |           | 10 x 15dd | diferente | 0,0001    |         |
|                   | MHM<br>x<br>MVM   | diferente | 40,21          | <0,0001 |                  |           | 7 x 15dd  | diferente | <0,0001   |         |
| 37°C<br>x<br>TA   | RPMI              | diferente | 72,24          | <0,0001 |                  | TA        | RPMI      | 7 x 10dd  | diferente | <0,0001 |
|                   | MHM               | diferente | 77,17          | <0,0001 |                  |           |           | 10 x 15dd | diferente | 0,0005  |
|                   | MVM               | diferente | 69,73          | <0,0001 |                  |           |           | 7 x 15dd  | diferente | <0,0001 |
| TA                | RPMI<br>7/10/15dd | diferente | 33,7           | <0,0001 | MHM              |           | 7 x 10dd  | diferente | <0,0001   |         |
|                   | MHM<br>7/10/15dd  | diferente | 37,68          | <0,0001 |                  |           | 10 x 15dd | diferente | 0,0002    |         |
|                   | MVM<br>7/10/15dd  | diferente | 36,54          | <0,0001 | 7 x 15dd         |           | diferente | <0,0001   |           |         |
| TA<br>x<br>TA     | RPMI<br>x<br>MHM  | diferente | 89,92          | <0,0001 | MVM              | 7 x 10dd  | *         | *         |           |         |
|                   | RPMI<br>x<br>MVM  | diferente | 66,29          | <0,0001 |                  | 10 x 15dd | diferente | 0,0005    |           |         |
|                   | MHM<br>x<br>MVM   | diferente | 80,26          | <0,0001 | 7 x 15dd         | *         | *         |           |           |         |

Legenda:

dd \_ dias

x \_ comparado a ...

# \_ diferença

< \_ menor que

\* \_ Ausência de crescimento em 7 dias

TA \_ temperatura ambiente

Tabela 15: Tratamento estatístico dos valores de CIM para Itraconazol em diferentes condições experimentais

| ANÁLISE FRIEDMAN  |                   |           |                |         | ANÁLISE WILCOXON |      |           |           |           |        |
|-------------------|-------------------|-----------|----------------|---------|------------------|------|-----------|-----------|-----------|--------|
| Temperatura       | Meio/Leitura      | Resultado | Valor Friedman | Valor P | Temperatura      | Meio | Leitura   | Resultado | Valor P   |        |
| 37°C              | RPMI<br>7/10/15dd | diferente | 6              | 0,0498  | 37°C             | RPMI | 7 x 10dd  | sem #     | 0,5       |        |
|                   | MHM<br>7/10/15dd  | sem #     |                |         |                  |      | 10 x 15dd | sem #     | 0,5       |        |
|                   | MVM<br>7/10/15dd  | diferente | 18,17          | 0,0001  |                  |      | 7 x 15dd  | sem #     | 0,125     |        |
| 37°C<br>x<br>37°C | RPMI<br>x<br>MHM  | diferente | 78,24          | <0,0001 |                  | MHM  | 7 x 10dd  | sem #     | **        |        |
|                   | RPMI<br>x<br>MVM  | diferente | 15,03          | 0,0102  |                  |      | 10 x 15dd | sem #     | **        |        |
|                   | MHM<br>x<br>MVM   | diferente | 28,27          | <0,0001 |                  |      | 7 x 15dd  | sem #     | **        |        |
| 37°C<br>x<br>TA   | RPMI              | diferente | 63,58          | <0,0001 |                  | TA   | RPMI      | 7 x 10dd  | sem #     | 0,0625 |
|                   | MHM               | diferente | 28,99          | <0,0001 |                  |      |           | 10 x 15dd | sem #     | 0,125  |
|                   | MVM               | diferente | 42,08          | <0,0001 |                  |      |           | 7 x 15dd  | diferente | 0,0039 |
| TA                | RPMI<br>7/10/15dd | diferente | 13,56          | <0,0001 | MHM              |      | 7 x 10dd  | sem #     | 0,5       |        |
|                   | MHM<br>7/10/15dd  | diferente | 56,36          | 0,0597  |                  |      | 10 x 15dd | sem #     | 0,25      |        |
|                   | MVM<br>7/10/15dd  | diferente | 32,38          | <0,0001 |                  |      | 7 x 15dd  | sem #     | 0,25      |        |
| TA<br>x<br>TA     | RPMI<br>x<br>MHM  | diferente | 73,67          | <0,0001 | MVM              |      | 7 x 10dd  | diferente | 0,0003    |        |
|                   | RPMI<br>x<br>MVM  | diferente | 39,07          | <0,0001 |                  |      | 10 x 15dd | diferente | 0,0002    |        |
|                   | MHM<br>x<br>MVM   | diferente | 16,62          | 0,0053  |                  |      | 7 x 15dd  | diferente | 0,0003    |        |

Legenda:

dd \_ dias

x \_ comparado a ...

# \_ diferença

< \_ menor que

\*\* \_ mesmo valor de CIM em todos os períodos de incubação

TA \_ temperatura ambiente

Tabela 16: Tratamento estatístico dos valores de CIM para Cetoconazol em diferentes condições experimentais

| ANÁLISE FRIEDMAN  |                   |           |                |         | ANÁLISE WILCOXON |      |           |           |           |        |
|-------------------|-------------------|-----------|----------------|---------|------------------|------|-----------|-----------|-----------|--------|
| Temperatura       | Meio/Leitura      | Resultado | Valor Friedman | Valor P | Temperatura      | Meio | Leitura   | Resultado | Valor P   |        |
| 37°C              | RPMI<br>7/10/15dd | diferente | 6              | 0,0498  | 37°C             | RPMI | 7 x 10dd  | sem #     | 0,5       |        |
|                   | MHM<br>7/10/15dd  | sem #     |                |         |                  |      | 10 x 15dd | sem #     | 0,5       |        |
|                   | MVM<br>7/10/15dd  | diferente | 16,71          | 0,0002  |                  |      | 7 x 15dd  | sem #     | 0,125     |        |
| 37°C<br>x<br>37°C | RPMI<br>x<br>MHM  | diferente | 46,74          | <0,0001 |                  | MHM  | 7 x 10dd  | sem #     | **        |        |
|                   | RPMI<br>x<br>MVM  | diferente | 11,95          | 0,0355  |                  |      | 10 x 15dd | sem #     | **        |        |
|                   | MHM<br>x<br>MVM   | diferente | 38,67          | <0,0001 |                  |      | 7 x 15dd  | sem #     | **        |        |
| 37°C<br>x<br>TA   | RPMI              | diferente | 59,33          | <0,0001 |                  | TA   | RPMI      | 7 x 10dd  | diferente | 0,0078 |
|                   | MHM               | diferente | 12,05          | 0,0342  |                  |      |           | 10 x 15dd | sem #     | 0,125  |
|                   | MVM               | diferente | 53,43          | <0,0001 |                  |      |           | 7 x 15dd  | diferente | 0,005  |
| TA                | RPMI<br>7/10/15dd | diferente | 18,67          | <0,0001 | MHM              |      | 7 x 10dd  | sem #     | 0,125     |        |
|                   | MHM<br>7/10/15dd  | diferente | 9,33           | 0,0094  |                  |      | 10 x 15dd | sem #     | 0,5       |        |
|                   | MVM<br>7/10/15dd  | diferente | 32,38          | <0,0001 |                  |      | 7 x 15dd  | diferente | 0,0313    |        |
| TA<br>x<br>TA     | RPMI<br>x<br>MHM  | diferente | 83,92          | <0,0001 | MVM              |      | 7 x 10dd  | diferente | 0,0003    |        |
|                   | RPMI<br>x<br>MVM  | diferente | 38,70          | <0,0001 |                  |      | 10 x 15dd | diferente | 0,0002    |        |
|                   | MHM<br>x<br>MVM   | diferente | 66,08          | <0,0001 |                  |      | 7 x 15dd  | diferente | 0,0003    |        |

Legenda:

dd \_ dias

x \_ comparado a ...

# \_ diferença

< \_ menor que

\*\* \_ mesmo valor de CIM em todos os períodos de incubação

TA \_ temperatura ambiente

Tabela 17: Tratamento estatístico dos valores de CIM para Fluconazol em diferentes condições experimentais

| ANÁLISE FRIEDMAN  |                   |           |                |         | ANÁLISE WILCOXON |      |           |           |           |        |
|-------------------|-------------------|-----------|----------------|---------|------------------|------|-----------|-----------|-----------|--------|
| Temperatura       | Meio/Leitura      | Resultado | Valor Friedman | Valor P | Temperatura      | Meio | Leitura   | Resultado | Valor P   |        |
| 37°C              | RPMI<br>7/10/15dd | diferente | 19,51          | <0,0001 | 37°C             | RPMI | 7 x 10dd  | sem #     | 0,125     |        |
|                   | MHM<br>7/10/15dd  | diferente | 13             | 0,0015  |                  |      | 10 x 15dd | diferente | 0,0039    |        |
|                   | MVM<br>7/10/15dd  | diferente | 7,923          | 0,0190  |                  |      | 7 x 15dd  | diferente | 0,0156    |        |
| 37°C<br>x<br>37°C | RPMI<br>x<br>MHM  | diferente | 61,82          | <0,0001 |                  | MHM  | 7 x 10dd  | diferente | 0,0313    |        |
|                   | RPMI<br>x<br>MVM  | diferente | 17,24          | 0,0041  |                  |      | 10 x 15dd | sem #     | 0,5       |        |
|                   | MHM<br>x<br>MVM   | sem #     | 9,991          | 0,0755  |                  |      | 7 x 15dd  | diferente | 0,0078    |        |
| 37°C<br>x<br>TA   | RPMI              | diferente | 56,19          | <0,0001 |                  | TA   | RPMI      | 7 x 10dd  | diferente | 0,0313 |
|                   | MHM               | sem #     | 9,08           | 0,1059  |                  |      |           | 10 x 15dd | sem #     | 0,5    |
|                   | MVM               | diferente | 41,87          | <0,0001 |                  |      |           | 7 x 15dd  | diferente | 0,156  |
| TA                | RPMI<br>7/10/15dd | diferente | 12,09          | 0,0024  | MHM              |      | 7 x 10dd  | sem #     | 0,25      |        |
|                   | MHM<br>7/10/15dd  | diferente | 10,57          | 0,0051  |                  |      | 10 x 15dd | sem #     | 0,125     |        |
|                   | MVM<br>7/10/15dd  | diferente | 36,68          | <0,0001 |                  |      | 7 x 15dd  | diferente | 0,156     |        |
| TA<br>x<br>TA     | RPMI<br>x<br>MHM  | diferente | 73,96          | <0,0001 | MVM              |      | 7 x 10dd  | diferente | 0,0001    |        |
|                   | RPMI<br>x<br>MVM  | diferente | 74,53          | <0,0001 |                  |      | 10 x 15dd | diferente | 0,0005    |        |
|                   | MHM<br>x<br>MVM   | diferente | 48,06          | <0,0001 |                  |      | 7 x 15dd  | diferente | 0,0001    |        |

Legenda:

dd \_ dias  
x \_ comparado a ...  
# \_ diferença  
< \_ menor que  
TA \_ temperatura ambiente



Tabela 18: Tratamento estatístico dos valores de CIM para Sulfametoxazol em diferentes condições experimentais

| ANÁLISE FRIEDMAN  |                   |           |                |         | ANÁLISE WILCOXON |      |           |           |           |       |
|-------------------|-------------------|-----------|----------------|---------|------------------|------|-----------|-----------|-----------|-------|
| Temperatura       | Meio/Leitura      | Resultado | Valor Friedman | Valor P | Temperatura      | Meio | Leitura   | Resultado | Valor P   |       |
| 37°C              | RPMI<br>7/10/15dd | diferente | 24             | <0,0001 | 37°C             | RPMI | 7 x 10dd  | sem #     |           |       |
|                   | MHM<br>7/10/15dd  | sem #     | 3              | 0,2231  |                  |      | 10 x 15dd | diferente | 0,0005    |       |
|                   | MVM<br>7/10/15dd  | diferente | 9,385          | 0,0092  |                  |      | 7 x 15dd  | diferente | 0,0005    |       |
| 37°C<br>x<br>37°C | RPMI<br>x<br>MHM  | diferente | 82,07          | <0,0001 |                  | MHM  | 7 x 10dd  | sem #     | 1,0       |       |
|                   | RPMI<br>x<br>MVM  | diferente | 97,52          | <0,0001 |                  |      | 10 x 15dd | sem #     | 1,0       |       |
|                   | MHM<br>x<br>MVM   | diferente | 81,20          | <0,0001 |                  |      | 7 x 15dd  | sem #     | 0,5       |       |
| 37°C<br>x<br>TA   | RPMI              | diferente | 49,16          | <0,0001 |                  | TA   | RPMI      | 7 x 10dd  | diferente | 0,002 |
|                   | MHM               | diferente | 29,83          | <0,0001 |                  |      |           | 10 x 15dd | sem #     | ***   |
|                   | MVM               | diferente | 51,51          | <0,0001 |                  |      |           | 7 x 15dd  | sem #     | ***   |
| TA                | RPMI<br>7/10/15dd | diferente | 23,33          | <0,0001 | MHM              |      | 7 x 10dd  | sem #     | 0,125     |       |
|                   | MHM<br>7/10/15dd  | diferente | 11             | 0,0041  |                  |      | 10 x 15dd | sem #     | 0,125     |       |
|                   | MVM<br>7/10/15dd  | diferente | 37,14          | <0,0001 |                  |      | 7 x 15dd  | diferente | 0,1156    |       |
| TA<br>x<br>TA     | RPMI<br>x<br>MHM  | diferente | 67,22          | <0,0001 | MVM              |      | 7 x 10dd  | diferente | 0,0001    |       |
|                   | RPMI<br>x<br>MVM  | diferente | 100,7          | <0,0001 |                  |      | 10 x 15dd | diferente | 0,0020    |       |
|                   | MHM<br>x<br>MVM   | diferente | 101,1          | <0,0001 |                  |      | 7 x 15dd  | diferente | 0,0001    |       |

Legenda:

dd \_ dias

x \_ comparado a ...

# \_ diferença

< \_ menor que

\*\*\* \_ mesmo valor de CIM em 15 dias de incubação

TA \_ temperatura ambiente

Tabela 19: Tratamento estatístico dos valores de CIM para Bactrim® em diferentes condições experimentais

| ANÁLISE FRIEDMAN  |                   |           |                |         | ANÁLISE WILCOXON |      |           |           |           |        |
|-------------------|-------------------|-----------|----------------|---------|------------------|------|-----------|-----------|-----------|--------|
| Temperatura       | Meio/Leitura      | Resultado | Valor Friedman | Valor P | Temperatura      | Meio | Leitura   | Resultado | Valor P   |        |
| 37°C              | RPMI<br>7/10/15dd | diferente | 23,23          | <0,0001 | 37°C             | RPMI | 7 x 10dd  | sem #     | 0,0625    |        |
|                   | MHM<br>7/10/15dd  | diferente | 6,5            | 0,0388  |                  |      | 10 x 15dd | diferente | 0,0010    |        |
|                   | MVM<br>7/10/15dd  | diferente | 16,55          | 0,0003  |                  |      | 7 x 15dd  | diferente | 0,0001    |        |
| 37°C<br>x<br>37°C | RPMI<br>x<br>MHM  | diferente | 50,77          | <0,0001 |                  | MHM  | 7 x 10dd  | sem #     | 1,0       |        |
|                   | RPMI<br>x<br>MVM  | diferente | 98,53          | <0,0001 |                  |      | 10 x 15dd | sem #     | 0,25      |        |
|                   | MHM<br>x<br>MVM   | diferente | 99,83          | <0,0001 |                  |      | 7 x 15dd  | sem #     | 0,125     |        |
| 37°C<br>x<br>TA   | RPMI              | diferente | 61,47          | <0,0001 |                  | TA   | RPMI      | 7 x 10dd  | diferente | 0,0313 |
|                   | MHM               | diferente | 23,21          | 0,0003  |                  |      |           | 10 x 15dd | sem #     | ***    |
|                   | MVM               | diferente | 46,78          | <0,0001 |                  |      |           | 7 x 15dd  | sem #     | ***    |
| TA                | RPMI<br>7/10/15dd | diferente | 18,54          | <0,0001 | MHM              |      | 7 x 10dd  | sem #     | 0,25      |        |
|                   | MHM<br>7/10/15dd  | diferente | 7,6            | 0,0224  |                  |      | 10 x 15dd | sem #     | 0,5       |        |
|                   | MVM<br>7/10/15dd  | diferente | 35,41          | <0,0001 |                  |      | 7 x 15dd  | sem #     | 0,0625    |        |
| TA<br>x<br>TA     | RPMI<br>x<br>MHM  | diferente | 56,95          | <0,0001 | MVM              |      | 7 x 10dd  | diferente | 0,0001    |        |
|                   | RPMI<br>x<br>MVM  | diferente | 100,1          | <0,0001 |                  |      | 10 x 15dd | diferente | 0,0010    |        |
|                   | MHM<br>x<br>MVM   | diferente | 99,49          | <0,0001 |                  |      | 7 x 15dd  | diferente | 0,0001    |        |

Legenda:

dd \_ dias  
x \_ comparado a ...  
# \_ diferença  
< \_ menor que  
\*\*\* \_ mesmo valor de CIM em 15 dias de incubação  
TA \_ temperatura ambiente

Tabela 20: Tratamento estatístico dos valores de CIM para Terbinafina em diferentes condições experimentais

| ANÁLISE FRIEDMAN  |                   |           |                |         | ANÁLISE WILCOXON |          |           |           |           |           |        |
|-------------------|-------------------|-----------|----------------|---------|------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|
| Temperatura       | Meio/Leitura      | Resultado | Valor Friedman | Valor P | Temperatura      | Meio     | Leitura   | Resultado | Valor P   |           |        |
| 37°C              | RPMI<br>7/10/15dd | diferente | 37,12          | <0,0001 | 37°C             | RPMI     | 7 x 10dd  | sem #     | 0,25      |           |        |
|                   | MHM<br>7/10/15dd  | diferente | 18,17          | <0,0001 |                  |          | 10 x 15dd | diferente | 0,0001    |           |        |
|                   | MVM<br>7/10/15dd  | diferente | 21             | <0,0001 |                  |          | 7 x 15dd  | diferente | <0,0001   |           |        |
| 37°C<br>x<br>37°C | RPMI<br>x<br>MHM  | diferente | 77,74          | <0,0001 |                  | 37°C     | MHM       | 7 x 10dd  | diferente | 0,0156    |        |
|                   | RPMI<br>x<br>MVM  | diferente | 38,73          | <0,0001 |                  |          |           | 10 x 15dd | sem #     | 0,0625    |        |
|                   | MHM<br>x<br>MVM   | diferente | 39,91          | <0,0001 |                  |          | 7 x 15dd  | diferente | 0,0005    |           |        |
| 37°C<br>x<br>25°C | RPMI              | diferente | 36,55          | <0,0001 |                  |          | 25°C      | RPMI      | 7 x 10dd  | diferente | 0,0005 |
|                   | MHM               | diferente | 54,13          | <0,0001 |                  |          |           |           | 10 x 15dd | diferente | 0,0156 |
|                   | MVM               | diferente | 42,54          | <0,0001 |                  |          |           |           | 7 x 15dd  | diferente | 0,0001 |
| 25°C              | RPMI<br>7/10/15dd | diferente | 24,3           | <0,0001 | 25°C             | MHM      |           | 7 x 10dd  | diferente | 0,002     |        |
|                   | MHM<br>7/10/15dd  | diferente | 22,37          | <0,0001 |                  |          |           | 10 x 15dd | sem #     | 0,0625    |        |
|                   | MVM<br>7/10/15dd  | diferente | 34,35          | <0,0001 |                  | 7 x 15dd |           | diferente | <0,0001   |           |        |
| 25°C<br>x<br>25°C | RPMI<br>x<br>MHM  | diferente | 34,55          | <0,0001 |                  | 25°C     |           | MVM       | 7 x 10dd  | diferente | 0,0002 |
|                   | RPMI<br>x<br>MVM  | diferente | 52,74          | <0,0001 |                  |          |           |           | 10 x 15dd | diferente | 0,0001 |
|                   | MHM<br>x<br>MVM   | diferente | 46,93          | <0,0001 |                  |          |           | 7 x 15dd  | diferente | 0,0002    |        |

Legenda:

dd \_ dias

x \_ comparado a ...

# \_ diferença

< \_ menor que

TA: temperatura ambiente

**Anexo E:**  
**Aspecto morfológico de *P. brasiliensis***  
**em diferentes meios de cultura a 37°C**

Tabela 21: Acompanhamento do aspecto morfológico de *P. brasiliensis* sob diferentes condições de determinação de CIM, à 37°C.

| Amostras       | YPD líquido |     |     |      |      | RPMI líquido |     |     |      |      | RPMI com 2% de glicose |       |       |       |       | MHM líquido |     |     |      |      |
|----------------|-------------|-----|-----|------|------|--------------|-----|-----|------|------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------|-----|-----|------|------|
|                | 2dd         | 5dd | 7dd | 10dd | 15dd | 2dd          | 5dd | 7dd | 10dd | 15dd | 2dd                    | 5dd   | 7dd   | 10dd  | 15dd  | 2dd         | 5dd | 7dd | 10dd | 15dd |
| <b>Ed01</b>    | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)          | (L) | (F) | (F)  | (F)  | (L)                    | (L)   | (L)   | (L/F) | (L/F) | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  |
| <b>Pb01</b>    | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)          | (L) | (L) | (L)  | (F)  | (L)                    | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  |
| <b>Pb2</b>     | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)          | (L) | (L) | (L)  | (F)  | (L)                    | (L)   | (L)   | (L/F) | (L/F) | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  |
| <b>Pb03</b>    | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)          | (L) | (L) | (F)  | (F)  | (L)                    | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  |
| <b>Pb5</b>     | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)          | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)                    | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  |
| <b>B339</b>    | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)          | (L) | (F) | (F)  | (F)  | (L)                    | (L)   | (L)   | (L/F) | (L/F) | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  |
| <b>Utero</b>   | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)          | (L) | (L) | (F)  | (F)  | (L)                    | (L)   | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  |
| <b>Pb13</b>    | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)          | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)                    | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  |
| <b>Pb10</b>    | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)          | (L) | (F) | (F)  | (F)  | (-)                    | (-)   | (-)   | (-)   | (L/F) | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  |
| <b>Pb09</b>    | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)          | (L) | (L) | (F)  | (F)  | (L)                    | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  |
| <b>Pinguim</b> | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)          | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)                    | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  |
| <b>Tatu</b>    | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)          | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)                    | (L)   | (L)   | (L)   | (L)   | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  |
| <b>Pb9</b>     | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)          | (L) | (L) | (F)  | (F)  | (L)                    | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  |
| <b>Pb18</b>    | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  | (L)          | (L) | (F) | (F)  | (F)  | (L)                    | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L/F) | (L)         | (L) | (L) | (L)  | (L)  |

Legenda:

dd \_ dias

(L) \_ morfologia leveduriforme

(F) \_ morfologia filamentosa

(L/F) \_ morfologia leveduriforme / filamentosa

(-) \_ ausência de crescimento

## **Anexo F:**

**Síntese dos resultados obtidos na  
determinação de CIM de antifúngicos  
frente a *P. brasiliensis* após 15 dias  
de incubação em diferentes meios e  
temperaturas**

Tabela 22: Valores de CIM, após 15 dias de incubação, dos antimicrobianos Anfotericina B, Itraconazol, Cetoconazol, Fluconazol, Sulfametoxazol, Bactrim® e Terbinafina frente a 21 amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* cultivados em diferentes meios de cultura a 37°C.

| Amostras | CIM (µg/mL)    |       |        |             |        |        |             |        |        |            |       |        |                |      |       |          |       |       |             |        |        |
|----------|----------------|-------|--------|-------------|--------|--------|-------------|--------|--------|------------|-------|--------|----------------|------|-------|----------|-------|-------|-------------|--------|--------|
|          | Anfotericina B |       |        | Itraconazol |        |        | Cetoconazol |        |        | Fluconazol |       |        | Sulfametoxazol |      |       | Bactrim® |       |       | Terbinafina |        |        |
|          | RPMI           | MHM   | MVM    | RPMI        | MHM    | MVM    | RPMI        | MHM    | MVM    | RPMI       | MHM   | MVM    | RPMI           | MHM  | MVM   | RPMI     | MHM   | MVM   | RPMI        | MHM    | MVM    |
| Ed01     | 1,0            | 0,25  | 1,0    | 0,015       | 0,0039 | 0,062  | 0,0039      | 0,0019 | 0,015  | 2,0        | 0,25  | 1,0    | 300            | 75   | 2,34  | 300      | 150   | 4,68  | 0,25        | 0,0078 | 0,25   |
| 1578     | 0,5            | 0,125 | 0,0078 | 0,031       | 0,0039 | 0,0039 | 0,0019      | 0,0019 | 0,0019 | 0,5        | 0,5   | 0,0078 | 300            | 37,5 | 1,17  | 75       | 37,5  | 1,17  | 0,25        | 0,25   | 0,0078 |
| Pb01     | 1,0            | 0,25  | -      | 0,0078      | 0,0039 | -      | 0,0019      | 0,0019 | -      | 0,5        | 0,25  | -      | 150            | 75   | -     | 150      | 75    | -     | 0,125       | 0,015  | -      |
| Pb4      | 1,0            | 0,125 | 1,0    | 0,062       | 0,0039 | 0,25   | 0,031       | 0,0019 | 0,031  | 8,0        | 1,0   | 1,0    | 300            | 150  | 4,68  | 300      | 150   | 4,68  | 0,5         | 0,125  | 1,0    |
| Pb2      | 0,25           | 0,125 | 0,031  | 0,0078      | 0,0039 | 0,0078 | 0,0019      | 0,0019 | 0,0039 | 0,5        | 0,25  | 0,5    | 150            | 150  | 2,34  | 150      | 75    | 4,68  | 0,5         | 0,015  | 0,5    |
| Pb03     | 1,0            | 1,0   | 0,5    | 0,015       | 0,0039 | 0,25   | 0,015       | 0,0019 | 0,031  | 2,0        | 1,0   | 2,0    | 300            | 150  | 4,68  | 300      | 300   | 9,37  | 0,5         | 0,062  | 1,0    |
| Pb6      | 1,0            | 0,25  | 0,062  | 0,0078      | 0,0039 | 0,0078 | 0,0019      | 0,0019 | 0,0078 | 0,5        | 0,25  | 1,0    | 300            | 75   | 4,68  | 300      | 150   | 2,34  | 0,25        | 0,015  | 0,5    |
| Pb5      | 1,0            | 0,25  | 0,125  | 0,015       | 0,0039 | 0,0078 | 0,0078      | 0,0019 | 0,0039 | 1,0        | 0,25  | 1,0    | 300            | 75   | 18,75 | 300      | 75    | 9,37  | 0,5         | 0,031  | 0,5    |
| B339     | 1,0            | 0,125 | 0,031  | 0,0039      | 0,0039 | 0,0078 | 0,0019      | 0,0019 | 0,0078 | 0,5        | 1,0   | 1,0    | 150            | 150  | 9,37  | 300      | 150   | 9,37  | 0,25        | 0,031  | 0,5    |
| Utero    | 1,0            | 0,25  | 1,0    | 0,0039      | 0,0039 | 0,015  | 0,0019      | 0,0019 | 0,0078 | 0,5        | 0,25  | 0,125  | 300            | 75   | 1,17  | 150      | 75    | 1,17  | 0,25        | 0,015  | 0,125  |
| Pb11     | 0,5            | 0,25  | 0,5    | 0,062       | 0,0039 | 0,015  | 0,031       | 0,0019 | 0,0078 | 8,0        | 0,5   | 0,5    | 150            | 9,37 | 1,17  | 150      | 18,75 | 1,17  | 0,5         | 0,031  | 0,5    |
| Pb13     | 0,25           | 0,125 | 1      | 0,0039      | 0,0039 | 0,015  | 0,0019      | 0,0019 | 0,0039 | 0,25       | 0,125 | 0,5    | 150            | 75   | 4,68  | 300      | 150   | 4,68  | 0,25        | 0,015  | 1,0    |
| Pb10     | 1,0            | 0,25  | 0,5    | 0,0078      | 0,0039 | 0,062  | 0,0019      | 0,0019 | 0,0078 | 2,0        | 0,125 | 0,5    | 150            | 75   | 2,34  | 150      | 75    | 4,68  | 0,5         | 0,015  | 0,5    |
| Pb14     | 2,0            | 0,125 | 2,0    | 0,0078      | 0,0039 | 0,0039 | 0,0019      | 0,0019 | 0,0019 | 0,5        | 0,125 | 0,25   | 300            | 150  | 4,68  | 150      | 150   | 4,68  | 0,25        | 0,015  | 1,0    |
| 63265    | 1,0            | 0,25  | 0,5    | 0,0078      | 0,0039 | 0,0039 | 0,0019      | 0,0019 | 0,0039 | 0,5        | 0,25  | 0,25   | 300            | 37,5 | 1,17  | 150      | 75    | 1,17  | 0,125       | 0,015  | 0,25   |
| Pb09     | 1,0            | 0,25  | 0,062  | 0,062       | 0,0039 | 0,0078 | 0,0039      | 0,0019 | 0,0078 | 1,0        | 0,5   | 1,0    | 300            | 150  | 18,75 | 300      | 300   | 9,37  | 0,5         | 0,015  | 1,0    |
| Pinguim  | 1,0            | 0,25  | 0,062  | 0,0039      | 0,0039 | 0,0078 | 0,0078      | 0,0019 | 0,0078 | 2,0        | 1,0   | 1,0    | 300            | 150  | 18,75 | 150      | 150   | 18,75 | 0,5         | 0,125  | 0,5    |
| Tatu     | 1,0            | 0,25  | 0,5    | 0,0078      | 0,0039 | 0,0039 | 0,015       | 0,0019 | 0,0039 | 1,0        | 0,125 | 0,25   | 300            | 75   | 2,34  | 300      | 75    | 4,68  | 0,25        | 0,0078 | 0,5    |
| Pb9      | 2,0            | 0,25  | 1,0    | 0,015       | 0,0039 | 0,015  | 0,0039      | 0,0019 | 0,0039 | 1,0        | 0,062 | 0,25   | 300            | 75   | 1,17  | 150      | 37,5  | 2,34  | 0,25        | 0,25   | 0,5    |
| Pb8      | 1,0            | 0,25  | -      | 0,062       | 0,0039 | -      | 0,0039      | 0,0019 | -      | 1,0        | 0,25  | -      | 300            | 75   | -     | 150      | 75    | -     | 0,5         | 0,031  | -      |
| Pb18     | 1,0            | 0,25  | 0,031  | 0,0039      | 0,0039 | 0,0078 | 0,0019      | 0,0019 | 0,0078 | 0,25       | 0,25  | 1,0    | 300            | 150  | 18,75 | 150      | 150   | 4,68  | 0,25        | 0,031  | 1,0    |

Legenda:

(-) ausência de crescimento

Tabela 23: Valores de CIM, após 15 dias de incubação, dos antimicrobianos Anfotericina B, Itraconazol, Cetoconazol, Fluconazol, Sulfametoxazol, Bactrim® e Terbinafina frente a 21 amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* cultivados em diferentes meios de cultura em TA

| Amostras | CIM (µg/mL)    |       |       |             |        |        |             |        |        |            |       |       |                |      |       |          |     |       |             |       |       |
|----------|----------------|-------|-------|-------------|--------|--------|-------------|--------|--------|------------|-------|-------|----------------|------|-------|----------|-----|-------|-------------|-------|-------|
|          | Anfotericina B |       |       | Itraconazol |        |        | Cetoconazol |        |        | Fluconazol |       |       | Sulfametoxazol |      |       | Bactrim® |     |       | Terbinafina |       |       |
|          | RPMI           | MHM   | MVM   | RPMI        | MHM    | MVM    | RPMI        | MHM    | MVM    | RPMI       | MHM   | MVM   | RPMI           | MHM  | MVM   | RPMI     | MHM | MVM   | RPMI        | MHM   | MVM   |
| Ed01     | 1,0            | 0,015 | 1,0   | 0,031       | 0,0039 | 0,0039 | 0,015       | 0,0019 | 0,015  | 1,0        | 0,125 | 0,125 | 300            | 37,5 | 9,37  | 300      | 75  | 1,17  | 0,015       | 0,062 | 0,062 |
| 1578     | 1,0            | 0,125 | 1,0   | 0,062       | 0,0039 | 0,125  | 0,015       | 0,0019 | 0,015  | 2,0        | 0,5   | 0,062 | 300            | 150  | 9,37  | 300      | 150 | 4,68  | 1,0         | 0,125 | 0,031 |
| Pb01     | 0,25           | 0,25  | -     | 0,015       | 0,0039 | -      | 0,125       | 0,0019 | -      | 0,5        | 0,25  | -     | 300            | 75   | -     | 300      | 75  | -     | 0,25        | 0,062 | -     |
| Pb4      | 0,5            | 0,031 | 1,0   | 0,125       | 0,125  | 0,031  | 0,062       | 0,0078 | 0,015  | 8,0        | 2,0   | 0,031 | 300            | 300  | 4,68  | 300      | 300 | 2,34  | 1,0         | 0,25  | 0,125 |
| Pb2      | 1,0            | 0,015 | 1,0   | 0,062       | 0,0039 | 0,015  | 0,031       | 0,0019 | 0,031  | 2,0        | 0,25  | 0,25  | 300            | 150  | 4,68  | 300      | 150 | 9,37  | 1,0         | 0,062 | 0,031 |
| Pb03     | 1,0            | 0,062 | 1,0   | 0,015       | 0,0039 | 0,015  | 0,0078      | 0,0019 | 0,015  | 1,0        | 0,062 | 0,062 | 300            | 150  | 9,37  | 300      | 300 | 18,75 | 0,0078      | 0,062 | 0,031 |
| Pb6      | 1,0            | 0,015 | 0,031 | 0,062       | 0,0039 | 0,125  | 0,062       | 0,0019 | 0,062  | 2,0        | 0,25  | 2,0   | 300            | 150  | 37,5  | 300      | 150 | 9,37  | 2,0         | 0,062 | 1,0   |
| Pb5      | 1,0            | 0,125 | 1,0   | 0,031       | 0,0039 | 0,062  | 0,015       | 0,0019 | 0,062  | 2,0        | 0,125 | 0,5   | 300            | 300  | 18,75 | 300      | 300 | 9,37  | 0,031       | 0,25  | 0,062 |
| B339     | 0,25           | 0,125 | 2,0   | 0,062       | 0,0039 | 0,031  | 2,0         | 0,0039 | 0,062  | 1,0        | 2,0   | 0,5   | 300            | 75   | 1,17  | 300      | 75  | 18,75 | 2,0         | 0,125 | 0,125 |
| Utero    | 1,0            | 0,062 | 0,062 | 0,062       | 0,0039 | 0,125  | 0,062       | 0,0019 | 0,062  | 2,0        | 0,125 | 4,0   | 300            | 150  | 37,5  | 300      | 300 | 75    | 2,0         | 0,062 | 1,0   |
| Pb11     | 0,5            | 0,031 | 2,0   | 0,125       | 0,0039 | 0,0039 | 0,25        | 0,0019 | 0,062  | 8,0        | 0,25  | 0,031 | 300            | 37,5 | 4,68  | 300      | 75  | 2,34  | 1,0         | 0,062 | 0,062 |
| Pb13     | 1,0            | 0,031 | 1,0   | 0,0078      | 0,0078 | 0,031  | 0,0078      | 0,0019 | 0,062  | 1,0        | 0,25  | 0,125 | 300            | 300  | 9,37  | 300      | 300 | 4,68  | 1,0         | 0,25  | 0,125 |
| Pb10     | 0,5            | 0,031 | 1,0   | 0,125       | 0,0039 | 0,125  | 0,062       | 0,0019 | 0,031  | 8,0        | 0,5   | 0,25  | 300            | 150  | 9,37  | 300      | 75  | 9,37  | 2,0         | 0,062 | 0,062 |
| Pb14     | 1,0            | 0,031 | 0,031 | 0,125       | 0,0039 | 0,125  | 0,031       | 0,0019 | 0,062  | 4,0        | 0,125 | 4,0   | 300            | 150  | 37,5  | 300      | 150 | 75    | 0,062       | 0,25  | 2,0   |
| 63265    | 1,0            | 0,062 | 0,5   | 0,062       | 0,031  | 0,062  | 0,015       | 0,0019 | 0,062  | 2,0        | 0,5   | 0,5   | 300            | 150  | 1,17  | 300      | 150 | 1,17  | 0,5         | 0,125 | 1,0   |
| Pb09     | 0,25           | 0,25  | 0,5   | 0,031       | 0,0039 | 0,0039 | 0,031       | 0,0019 | 0,031  | 2,0        | 1,0   | 0,062 | 300            | 150  | 4,68  | 300      | 150 | 9,37  | 0,015       | 0,5   | 0,031 |
| Pinguim  | 0,25           | 0,5   | 2,0   | 0,031       | 0,0078 | 0,062  | 0,0078      | 0,0078 | 0,062  | 2,0        | 2,0   | 0,125 | 300            | 150  | 1,17  | 300      | 150 | 4,68  | 2,0         | 1,0   | 0,125 |
| Tatu     | 0,25           | 0,031 | 2,0   | 0,062       | 0,0039 | 0,015  | 0,25        | 0,0019 | 0,031  | 2,0        | 0,25  | 0,062 | 300            | 150  | 9,37  | 300      | 150 | 9,37  | 0,5         | 0,062 | 0,031 |
| Pb9      | 1,0            | 0,062 | 2,0   | 0,062       | 0,031  | 0,015  | 0,031       | 0,0019 | 0,062  | 4,0        | 0,5   | 0,5   | 300            | 150  | 9,37  | 300      | 150 | 2,34  | 1,0         | 0,25  | 0,062 |
| Pb8      | 1,0            | 0,031 | 2,0   | 0,015       | 0,0039 | 0,125  | 0,0039      | 0,0019 | 0,031  | 1,0        | 0,062 | 0,5   | 300            | 300  | 4,68  | 300      | 150 | 4,68  | 0,5         | 0,125 | 0,062 |
| Pb18     | 0,5            | 0,031 | 0,125 | 0,062       | 0,062  | 0,015  | 0,25        | 0,0019 | 0,0078 | 2,0        | 1,0   | 0,5   | 300            | 150  | 1,17  | 300      | 150 | 1,17  | 4,0         | 0,25  | 1,0   |

Legenda:

(-) ausência de crescimento



**Anexo G:**  
**Ação fungicida ou fungistática de**  
**antifúngicos**

Tabela 27: Ação fungicida ou fungistática de antifúngicos frente às amostras de *P. brasiliensis* provenientes do ensaio de determinação de CIM com os meios RPMI e MHM à 37°C

| Amostras     | Anfotericina B         |                       |                        |                       | Itraconazol            |                       |                        |                       | Fluconazol            |                        |                        |                        | Sulfametoxazol         |                       |                        |                       | Bactrim®               |                        |                        |                       | Terbinafina            |                       |                        |                        |
|--------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
|              | RPMI                   |                       | MHM                    |                       | RPMI                   |                       | MHM                    |                       | RPMI                  |                        | MHM                    |                        | RPMI                   |                       | MHM                    |                       | RPMI                   |                        | MHM                    |                       | RPMI                   |                       | MHM                    |                        |
| Ed01         | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                    | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    |                        |                        |
| 1578         | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fe                    | Fe                    | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fe                    | Fc                     | Fe                    | Fc                     | Fe                     | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fe                    |                        |                        |
| Pb01         | Fc                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                    | Fe                     | Fc                     | Fe                     | Fc                     | Fe                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fe                    |                        |                        |
| Pb4          | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fe                    | Fc                    | Fe                     | Fc                     | Fe                     | Fe                     | Fe                    | Fe                     | Fe                    | Fe                     | Fe                     | Fe                     | Fe                    | Fe                     | Fe                    |                        |                        |
| Pb2          | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fe                    | Fe                    | Fc                     | Fc                     | Fe                     | Fc                     | Fe                    | Fe                     | Fe                    | Fe                     | Fe                     | Fe                     | Fe                    | Fc                     | Fe                    |                        |                        |
| Pb03         | Fc                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fe                    | Fe                    | Fe                     | Fe                     | Fe                     | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fe                    | Fe                     | Fc                     | Fe                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    |                        |                        |
| Pb6          | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fe                    | Fe                    | Fc                     | Fc                     | Fe                     | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    |                        |                        |
| Pb5          | Fc                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fe                    | Fe                    | Fe                     | Fe                     | Fe                     | Fe                     | Fe                    | Fe                     | Fe                    | Fe                     | Fc                     | Fe                     | Fe                    | Fe                     | Fe                    |                        |                        |
| B339         | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                    | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    |                        |                        |
| Utero        | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fe                    | Fc                    | Fc                     | Fc                     | Fe                     | Fc                     | Fe                    | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fc                     | Fe                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    |                        |                        |
| Pb11         | Fc                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fe                    | Fc                    | Fe                     | Fc                     | Fe                     | Fc                     | Fe                    | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fc                     | Fe                     | Fe                    | Fe                     | Fc                    |                        |                        |
| Pb13         | Fc                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                    | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fe                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    |                        |                        |
| Pb10         | Fc                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                    | Fe                     | Fc                     | Fe                     | Fe                     | Fe                    | Fe                     | Fc                    | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fe                    | Fe                     | Fc                    |                        |                        |
| Pb14         | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fe                    | Fc                    | Fe                     | Fc                     | Fe                     | Fc                     | Fe                    | Fe                     | Fe                    | Fe                     | Fe                     | Fe                     | Fe                    | Fe                     | Fe                    |                        |                        |
| 63265        | Fc                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fe                    | Fe                    | Fc                     | Fc                     | Fe                     | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fe                    | Fe                     | Fe                    |                        |                        |
| Pb09         | Fc                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fe                    | Fc                     | Fe                     | Fc                     | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fe                    |                        |                        |
| Pinguim      | Fc                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fe                    | Fe                    | Fe                     | Fe                     | Fe                     | Fc                     | Fe                    | Fe                     | Fe                    | Fe                     | Fe                     | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fe                    |                        |                        |
| Tatu         | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fe                    | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    |                        |                        |
| Pb9          | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                    | Fc                     | Fc                     | Fe                     | Fc                     | Fe                    | Fc                     | Fe                    | Fe                     | Fe                     | Fe                     | Fe                    | Fe                     | Fc                    |                        |                        |
| Pb8          | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fe                    | Fc                     | Fe                     | Fe                     | Fe                     | Fe                    | Fc                     | Fe                    | Fe                     | Fe                     | Fe                     | Fc                    | Fe                     | Fe                    |                        |                        |
| Pb18         | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fe                    | Fc                    | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fc                     | Fc                    | Fc                     | Fc                    | Fe                     | Fc                     | Fe                     | Fe                    | Fe                     | Fe                    |                        |                        |
| <b>Total</b> | <b>21</b><br><b>Fc</b> | <b>0</b><br><b>Fe</b> | <b>21</b><br><b>Fc</b> | <b>0</b><br><b>Fe</b> | <b>12</b><br><b>Fc</b> | <b>9</b><br><b>Fe</b> | <b>21</b><br><b>Fc</b> | <b>0</b><br><b>Fc</b> | <b>9</b><br><b>Fc</b> | <b>12</b><br><b>Fe</b> | <b>11</b><br><b>Fc</b> | <b>10</b><br><b>Fe</b> | <b>13</b><br><b>Fc</b> | <b>8</b><br><b>Fe</b> | <b>14</b><br><b>Fc</b> | <b>7</b><br><b>Fe</b> | <b>11</b><br><b>Fc</b> | <b>10</b><br><b>Fe</b> | <b>15</b><br><b>Fc</b> | <b>6</b><br><b>Fe</b> | <b>12</b><br><b>Fc</b> | <b>9</b><br><b>Fe</b> | <b>10</b><br><b>Fc</b> | <b>11</b><br><b>Fe</b> |

Legenda:

Fc \_ Fungicida

Fe \_ Fungistático

**Anexo H:**  
**Avaliação do crescimento de *P.***  
***brasiliensis* em subcultivos sucessivos**  
**nos meios MHM e MVM a 37°C**

Tabela 29: Análise do crescimento de *P. brasiliensis* em repiques sucessivos em diferentes meios de cultura, a 37°C

| Amostra        | MHM   |       |       |      |     | Amostra        | MH (s/ tiamina) |       |     | Amostra        | MVM   |       |       |       |
|----------------|-------|-------|-------|------|-----|----------------|-----------------|-------|-----|----------------|-------|-------|-------|-------|
|                | 1°R   | 2°R   | 3°R   | 4°R  | 5°R |                | 1°R             | 2°R   | 3°R |                | 1°R   | 2°R   | 3°R   | 4°R   |
| <b>Ed01</b>    | (+++) | (+++) | (-)   | (x)  | (x) | <b>Ed01</b>    | (++)            | (-)   | (x) | <b>Ed01</b>    | (+)   | (+++) | (+++) | (++)  |
| <b>1578</b>    | (+)   | (+)   | (-)   | (x)  | (x) | <b>1578</b>    | (++)            | (+)   | (+) | <b>1578</b>    | (+++) | (+++) | (+++) | (+++) |
| <b>Pb01</b>    | (+++) | (+++) | (+)   | (-)  | (x) | <b>Pb01</b>    | (++)            | (++)  | (-) | <b>Pb01</b>    | (+)   | (+)   | (++)  | (++)  |
| <b>Pb4</b>     | (+++) | (+)   | (++)  | (++) | (+) | <b>Pb4</b>     | (+)             | (+)   | (-) | <b>Pb4</b>     | (+++) | (+++) | (+++) | (++)  |
| <b>Pb2</b>     | (+++) | (+)   | (-)   | (x)  | (x) | <b>Pb2</b>     | (+++)           | (+)   | (-) | <b>Pb2</b>     | (+++) | (+++) | (++)  | (++)  |
| <b>Pb03</b>    | (+)   | (+)   | (-)   | (x)  | (x) | <b>Pb03</b>    | (+)             | (-)   | (x) | <b>Pb03</b>    | (++)  | (++)  | (+++) | (++)  |
| <b>Pb6</b>     | (+)   | (+)   | (+)   | (-)  | (x) | <b>Pb6</b>     | (+)             | (+)   | (+) | <b>Pb6</b>     | (+++) | (+++) | (+++) | (+++) |
| <b>Pb5</b>     | (+++) | (+++) | (+++) | (++) | (+) | <b>Pb5</b>     | (++)            | (+)   | (-) | <b>Pb5</b>     | (+++) | (++)  | (+++) | (+++) |
| <b>B339</b>    | (+++) | (+)   | (-)   | (x)  | (x) | <b>B339</b>    | (++)            | (++)  | (-) | <b>B339</b>    | (+++) | (++)  | (+)   | (+)   |
| <b>Utero</b>   | (++)  | (+)   | (-)   | (x)  | (x) | <b>Utero</b>   | (+)             | (+)   | (-) | <b>Utero</b>   | (+++) | (+++) | (++)  | (++)  |
| <b>Pb11</b>    | (+)   | (+)   | (-)   | (x)  | (x) | <b>Pb11</b>    | (+)             | (+)   | (-) | <b>Pb11</b>    | (+)   | (+++) | (+++) | (+++) |
| <b>Pb13</b>    | (+++) | (+)   | (+)   | (-)  | (x) | <b>Pb13</b>    | (++)            | (+)   | (-) | <b>Pb13</b>    | (+++) | (+++) | (+++) | (+++) |
| <b>Pb10</b>    | (+)   | (-)   | (x)   | (x)  | (x) | <b>Pb10</b>    | (+)             | (+)   | (-) | <b>Pb10</b>    | (+++) | (+++) | (+++) | (+++) |
| <b>Pb14</b>    | (+)   | (-)   | (x)   | (x)  | (x) | <b>Pb14</b>    | (+)             | (+)   | (-) | <b>Pb14</b>    | (+++) | (+++) | (+++) | (+++) |
| <b>63265</b>   | (+++) | (++)  | (-)   | (x)  | (x) | <b>63265</b>   | (++)            | (+)   | (-) | <b>63265</b>   | (-)   | (x)   | (x)   | (x)   |
| <b>Pb09</b>    | (+++) | (+)   | (+)   | (-)  | (x) | <b>Pb09</b>    | (+)             | (-)   | (x) | <b>Pb09</b>    | (+++) | (+++) | (+)   | (+)   |
| <b>Pinguim</b> | (+++) | (+++) | (+)   | (+)  | (-) | <b>Pinguim</b> | (++)            | (+)   | (-) | <b>Pinguim</b> | (+++) | (+++) | (+++) | (+++) |
| <b>Tatu</b>    | (++)  | (+++) | (+)   | (+)  | (-) | <b>Tatu</b>    | (+++)           | (+++) | (-) | <b>Tatu</b>    | (+++) | (+++) | (+++) | (+++) |
| <b>Pb9</b>     | (+++) | (+)   | (-)   | (x)  | (x) | <b>Pb9</b>     | (++)            | (++)  | (-) | <b>Pb9</b>     | (+++) | (+++) | (++)  | (++)  |
| <b>Pb8</b>     | (+)   | (+)   | (-)   | (x)  | (x) | <b>Pb8</b>     | (+)             | (+)   | (-) | <b>Pb8</b>     | (+++) | (+++) | (++)  | (++)  |
| <b>Pb18</b>    | (+++) | (+)   | (-)   | (x)  | (x) | <b>Pb18</b>    | (+)             | (+)   | (-) | <b>Pb18</b>    | (+++) | (+++) | (+++) | (+++) |

Legenda:

- R \_ repique
- (-) \_ ausência de crescimento
- (+) \_ pequeno crescimento comparado a YPD
- (++) \_ crescimento intermediário comparado a YPD
- (+++)\_ crescimento semelhante a YPD
- (x) \_ ausência de repique

**Anexo I:**  
**Valores de CIM para sulfametoxazol**  
**obtidos em agar e caldo RPMI e agar YPD**

Tabela 30: Valores de CIM para sulfametoxazol determinados a 37°C frente a *P. brasiliensis* em caldo e ágar RPMI e em ágar YPD

| Amostras                        | Sulfametoxazol |                |                |
|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|                                 | Caldo RPMI     | Ágar RPMI      | Ágar YPD       |
| Ed01                            | 300            | 300            | 300            |
| 1578                            | 300            | 150            | 150            |
| Pb01                            | 150            | 150            | 150            |
| Pb4                             | 300            | 600            | 300            |
| Pb2                             | 150            | 300            | 150            |
| Pb03                            | 300            | 300            | 600            |
| Pb6                             | 300            | 150            | 150            |
| Pb5                             | 300            | 300            | 150            |
| B339                            | 150            | 300            | 150            |
| Utero                           | 300            | 150            | 150            |
| Pb11                            | 150            | 150            | 75             |
| Pb13                            | 150            | 300            | 300            |
| Pb10                            | 150            | 300            | 300            |
| Pb14                            | 300            | 600            | 300            |
| 63265                           | 300            | 150            | 75             |
| Pb09                            | 300            | 600            | 150            |
| Pinguim                         | 300            | 600            | 150            |
| Tatu                            | 300            | 300            | 150            |
| Pb9                             | 300            | 600            | 300            |
| Pb8                             | 300            | 300            | 150            |
| Pb18                            | 300            | 300            | 300            |
| <b>CIM<sub>50</sub> (µg/mL)</b> | <b>300,0</b>   | <b>300,0</b>   | <b>150,0</b>   |
| <b>CIM<sub>90</sub> (µg/mL)</b> | <b>300,0</b>   | <b>600,0</b>   | <b>300,0</b>   |
| <b>Méd.geom.(µg/mL)</b>         | <b>246,100</b> | <b>290,259</b> | <b>182,852</b> |

## 10. Relação da Produção Científica

**CRUZ, R. C.;** Oliveira, C S; Werneck, S M C; Cisalpino, P S. Subpopulações do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis* potencialmente resistentes a sulfametoxazol e um clone atípico mostrando um bloqueio na transição dimórfica. In: VII Fórum de Microbiologia Prof. Edmar Chartone de Souza, 2011, UFMG, Belo Horizonte. Apresentação Oral no VII Fórum de Microbiologia Prof. Edmar Chartone de Souza, 2011.

**CRUZ, R. C.;** Oliveira, C S; Werneck, S M C; Cisalpino, P S. Subpopulations of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* potentially resistant to sulfamethoxazole and an atypical clone showing a blockage on the dimorphic transition. In: XI International Meeting on Paracoccidioidomycosis, 2011, Taubaté, São Paulo. Resumos do XI International Meeting on Paracoccidioidomycosis, 2011.

Santos, P. C.; **CRUZ, R. C.;** Karklin, Y. C.; Cisalpino, P. S. Selection of subpopulations of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* tolerant to increasing concentrations of fluconazole. In: XI International Meeting on Paracoccidioidomycosis, 2011, Taubaté, São Paulo. Resumos do XI International Meeting on Paracoccidioidomycosis, 2011.

**CRUZ, R. C.;** Werneck, S M C; Oliveira, C S; Cisalpino, P. S. Seleção de subpopulações do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis* em concentrações crescentes de sulfametoxazol. In: VI Congresso Brasileiro de Micologia, 2010, Brasília, DF. Resumos do VI Congresso Brasileiro de Micologia, 2010.

Werneck, S. M. C.; **CRUZ, R. C.;** Oliveira, C. S.; Cisalpino, P. S. Manutenção e conservação de amostras do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis* por criopreservação, em diferentes condições experimentais. In: XIX Semana de Iniciação Científica da UFMG 2010, Belo Horizonte, MG. Resumos da XIX Semana de Iniciação Científica da UFMG 2010, 2010.

Karklin, Y. C. ; **CRUZ, R. C.;** Cisalpino, P. S. Seleção de subpopulações do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis* em concentrações crescentes



de fluconazol. In: VI Fórum de Microbiologia Prof. Ênio Cardillo Vieira, 2010, Belo Horizonte. Resumos do VI Fórum de Microbiologia Prof. Ênio Cardillo Vieira, 2010.

Oliveira, C. S.; **CRUZ, R. C.**; Santos, S. G.; Cisalpino, P. S.; Serufo, J. C. Identificação de amostras isoladas de candidíases sistêmicas provenientes de hospitais de Belo Horizonte e determinação de concentração inibitória mínima frente a antifúngicos. In: VI Fórum de Microbiologia Prof. Ênio Cardillo Vieira, 2010, Belo Horizonte. Resumos do VI Fórum de Microbiologia Prof. Ênio Cardillo Vieira, 2010.

Silvia Maria Cordeiro Werneck; **CRUZ, R. C.**; Carolina S Oliveira; Santos, Daniel de Assis; Soares, Betania Maria; Cisalpino, P. S. Determinação da concentração inibitória mínima de antifúngicos frente a *Paracoccidioides brasiliensis* por diluição em ágar. In: Semana do Conhecimento e Cultura da UFMG 2009, 2009, Belo Horizonte, MG. Resumos da Semana do Conhecimento e Cultura da UFMG 2009, 2009.

**CRUZ, R. C.**; Silvia Maria Cordeiro Werneck; Carolina S Oliveira; Santos, Daniel de Assis ; Soares, Betania Maria; Cisalpino, P. S. Determinação da concentração inibitória mínima de antifúngicos frente a *Paracoccidioides brasiliensis* por microdiluição: variações dimórficas. In: XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas, PE. Resumos do XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009.

**CRUZ, R. C.**; Silvia Maria Cordeiro Werneck; Carolina Santos Oliveira; Daniel de Assis; Soares, Betania Maria; Cisalpino, P. S. Influência de diferentes condições experimentais nos valores de concentrações inibitórias mínimas de antifúngicos e em variações dimórficas observadas em *Paracoccidioides brasiliensis*. In: XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas, PE. Resumos do XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009.

Carolina S Oliveira; Silvia Maria Cordeiro Werneck; **CRUZ, R. C.**; Cisalpino, P. S. Padronização das condições para manutenção de isolados do fungo

patogênico *Paracoccidioides brasiliensis* por criopreservação. In: XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas, PE. Resumos do XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009.

Silvia Maria Cordeiro Werneck; Carolina S Oliveira; **CRUZ, R. C.**; Cisalpino, Patrícia S. Adaptação do crescimento de isolados clínicos e ambientais de *Paracoccidioides brasiliensis* em meios sintéticos e padronização de inóculos experimentais. In: XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas, PE. Resumos do XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009.

**CRUZ, R C**; Silvia Maria Cordeiro Werneck; Carolina S Oliveira; Soares, Betania Maria; Cisalpino, P S. Variações dimórficas observadas em *Paracoccidioides brasiliensis* frente a diferentes condições experimentais adotadas para a determinação de concentração inibitória mínima de antifúngicos. In: V Fórum de Microbiologia Prof. José Noronha Pérez, Programa de Pós-graduação em Microbiologia, ICB/UFMG, 2009, Belo Horizonte, MG. Resumos do V Fórum de Microbiologia Prof. José Noronha Pérez, 2009.

Carolina S Oliveira; **CRUZ, R. C.**; Silvia Maria Cordeiro Werneck; Cisalpino, P S. Padronização das condições para a criopreservação de amostras do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Semana do Conhecimento e Cultura UFMG 2009, 2009, Belo Horizonte, MG. Resumos da Semana de Conhecimento e Cultura UFMG 2009, 2009.

Xavier, Paola C; **CRUZ, R. C.**; Resende, D; Lippi, A O; Paulsen, I; Serufo, J C; Santos, S G; Cisalpino, P S. Identificação de amostras isoladas de candidíase sistêmica provenientes de hospitais de Belo Horizonte e determinação de concentração inibitória mínima frente a antifúngicos. In: Semana do Conhecimento e Cultura da UFMG 2009, 2009, Belo Horizonte, MG. Resumos da Semana de Conhecimento e Cultura UFMG 2009, 2009.

Silvia Maria Cordeiro Werneck; Carolina S. Oliveira; **CRUZ, R. C.**; Cisalpino, P. S. Adaptação do crescimento de amostras clínicas e ambientais de *Paracoccidioides brasiliensis* em meios sintéticos e padronização de inóculos

experimentais. In: Semana do Conhecimento e Cultura da UFMG 2009, 2009, Belo Horizonte, MG. Resumos da Semana do Conhecimento e Cultura da UFMG 2009, 2009.

Bastos, Thaissa Oliveira; Soares, Betania Maria; **CRUZ, R. C.**; Cisalpino, P. S.; Mendes I C M; Beraldo, H; Gouvêa dos Santos, Raquel. In vitro screening of antimicrobials derived from 2-pyridineformamide thiosemicarbazones against *Cryptococcus sp.* In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2008, Águas de Lindóia. Resumo H-01 XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2008. p. 66-66.

**CRUZ, R. C.**; Silvia Maria Cordeiro Werneck; Soares, Betania Maria; Kohler Lidiane Meire; Cisalpino, P S. A técnica da microdiluição na determinação da concentração inibitória mínima de antifúngicos frente à *Paracoccidioides brasiliensis*. In: IV Fórum de Microbiologia Prof. Eduardo Osório Cisalpino, 2008, Belo Horizonte, MG. IV Fórum de Microbiologia Prof. Eduardo Osório Cisalpino, 2008.

Silvia Maria Cordeiro Werneck; **CRUZ, R. C.**; Cisalpino, P. S. Padronização de inóculo e adaptação do crescimento de isolados clínicos e ambientais de *Paracoccidioides brasiliensis* a meios sintéticos. In: Semana de Conhecimento e Cultura da UFMG 2008, 2008, Belo Horizonte, MG. Resumos da Semana de Conhecimento e Cultura da UFMG 2008, 2008.

Silvia Maria Cordeiro Werneck; **CRUZ, R. C.**; Cisalpino, P. S. Determinação por microdiluição da concentração inibitória mínima de antifúngicos frente ao fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Semana de Conhecimento e Cultura da UFMG 2008, 2008, Belo Horizonte, MG. Resumos da Semana de Conhecimento e Cultura da UFMG 2008, 2008.

Paiva, L. F. R.; **CRUZ, R. C.**; Gontijo P. C .A.; Linhares Natália Duarte; Carneiro Roberta de Azevedo; Wanderley E. M. G.; Cisalpino, P. S.; Moreira, Elizabeth Spangler Andrade. Caracterização fenotípica e genotípica de *Pseudomonas*

*Aeruginosa multirresistentes* (MR), Hospital das Clínicas - UFMG. In: III Fórum da Microbiologia, 2007, Belo Horizonte. Resumos do III Fórum da Pós-graduação em Microbiologia. Belo Horizonte / MG, 2007. v. I. p. 6-6.

Carneiro Roberta de Azevedo; Paiva, L. F. R.; Linhares, M. C.; **CRUZ, R. C.**; Araújo, Roberta Amália de Carvalho; Cisalpino, P S; Moreira, E S A. Padrões genéticos obtidos por amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD-PCR) para amostras clínicas e ambientais de *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas no Hospital das Clínicas/ UFMG, de 2002-2005. In: XVI Semana de Iniciação Científica da UFMG 2007, 2007, Belo Horizonte. Resumos da XVI Semana de Iniciação Científica da UFMG 2007, 2007.

Paiva, L. F. R.; Linhares Natália Duarte; Gontijo P. C. A.; **CRUZ, R. C.**; Carneiro Roberta de Azevedo; Linhares, M. C.; Wanderley E. M. G.; Santos Patricia Campi; Araújo, Roberta Amália de Carvalho; Cisalpino, P. S.; Moreira, E S A. Caracterização fenotípica e genotípica de *Pseudomonas aeruginosa multirresistentes* (MR), Hospital das Clínicas/UFMG. In: Simpósio de Infecção Hospitalar HC UFMG, 2007, Belo Horizonte. Resumos Simpósio de Infecção Hospitalar HC UFMG, 2007-, 2007.