



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**ESTUDO DOS FUNGOS DIMÓRFICOS *COCCIDIOIDES POSADASII*
E *HISTOPLASMA CAPSULATUM* VAR. *CAPSULATUM*:
CARACTERIZAÇÃO LABORATORIAL COM ÊNFASE NO PERFIL
DE SENSIBILIDADE AO SESQUITERPENO FARNESOL, *IN VITRO***

RITA AMANDA CHAVES DE LIMA

FORTALEZA/CE

2013

RITA AMANDA CHAVES DE LIMA

ESTUDO DOS FUNGOS DIMÓRFICOS *COCCIDIOIDES POSADASII* E *HISTOPLASMA CAPSULATUM* VAR. *CAPSULATUM*: CARACTERIZAÇÃO LABORATORIAL COM ÊNFASE NO PERFIL DE SENSIBILIDADE AO SESQUITERPENÓ FARNESOL, *IN VITRO*.

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.

FORTALEZA/CE

2013


Rita Amanda Chaves de Lima

ESTUDO DOS FUNGOS DIMÓRFICOS *COCCIDIOIDES POSADASII* E *HISTOPLASMA CAPSULATUM* VAR. *CAPSULATUM*: CARACTERIZAÇÃO LABORATORIAL COM ÊNFASE NO PERFIL DE SENSIBILIDADE AO SESQUITERPENO FARNESOL, *IN VITRO*.

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutorado.

Data da Defesa: 13/12/2013.

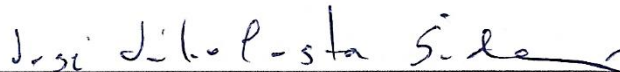
BANCA EXAMINADORA



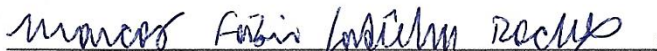
Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP



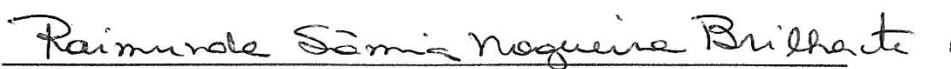
Profa. Dra. Cibelle Barreto Mano de Carvalho
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dr. José Júlio da Costa Sidrim
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha (Co-orientador)
Universidade Estadual do Ceará - UECE



Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

L732e Lima, Rita Amanda Chaves de.
Estudo dos fungos dimórficos *coccidioides posadasii* e *histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* : caracterização laboratorial com ênfase no perfil de sensibilidade ao sesquiterpeno farnesol, in vitro / Rita Amanda Chaves de Lima. – 2013.
113 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Microbiologia Humana e Animal
Orientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante
Coorientação: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

1. Coccidioides. 2. Histoplasma. 3. Biofilmes. I. Título.

*À minha tão amada família,
meus pais Ivete e Humberto e minhas irmãs
Karola e Letícia, razão dos meus esforços e da
minha vontade de vencer.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vontade e coragem de querer ir sempre adiante.

À minha orientadora Prof^ª Dr^ª Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, a quem serei sempre grata, por todos os ensinamentos, conselhos e tempo despendido que contribuíram de forma essencial para meu amadurecimento científico. Sobretudo pelo incentivo e credibilidade depositados em mim ao longo de todos esses anos sob sua orientação.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, agradeço pela orientação e constante disponibilidade, por cada contribuição e conhecimento compartilhado para a concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim pelo exemplo de competência e conhecimentos admiráveis, sobretudo por sua dedicação em fazer do CEMM um centro de referência em Micologia Médica, permitindo assim a capacitação de diversos profissionais, dentre professores, alunos e técnicos.

Aos membros da Banca Examinadora, por aceitarem cordialmente o convite.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica - UFC, que contribuíram para minha formação profissional.

À Prof^ª Dr^ª Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. André Jalles Monteiro, do Departamento de Matemática e Estatística Aplicada - UFC, pela análise estatística realizada nos dados deste trabalho.

À Dr^ª Débora Castelo Branco pela disponibilidade e auxílio na submissão dos artigos científicos resultantes do presente trabalho.

À técnica Terezinha de Jesus dos Santos Rodrigues pela boa vontade em partilhar sua experiência laboratorial.

À Carolinda Vilma Soares de Oliveira, secretária do PPGMM e Ivone Mary Fontenele de Sousa, secretária do PPGCM pela atenção e disponibilidade constantes.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP, pelo apoio financeiro.

A todos os alunos que fizeram ou fazem parte do CEMM, que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação profissional, pela agradável convivência, incentivo, apoio e amizade durante todos esses anos, especialmente por terem tornado essa jornada bem mais agradável. Consciente de que é impossível listar todos que de alguma forma me acrescentaram conhecimentos e experiências essenciais a minha formação, gostaria de particularmente expressar meu agradecimento:

Às ex-alunas do CEMM Juliane Lira, Patrícia Raquel, Delia Jéssica, Erica Helena, Lydia Pantoja, Camila Virgínio e Auxiliadora Fechine pelo convívio, auxílio, experiências e conhecimentos compartilhados, na base de minha formação acadêmica, quando aluna de iniciação científica. Em especial, à minha querida amiga Ana Karoline da Costa Ribeiro pelo exemplo de dedicação profissional, principalmente pelo apoio e incansável disponibilidade em dividir experiências e conhecimentos laboratoriais.

Aos meus grandes amigos João Jaime Giffoni Leite e Joyce Fonteles Ribeiro, por toda a força, apoio, principalmente pelo auxílio experimental e idéias efetivas concedidas para a realização e concretização das diferentes etapas deste trabalho.

À Erica Pacheco Caetano e Fca Jakelyne Marques pela troca de conhecimentos, auxílio experimental e amizade, especialmente durante as etapas finais desta pesquisa.

À Ângela Donato Maia e à Natalya Fechine Silva pelo carinho, amizade cumplicidade e apoio neste último ano de doutorado.

Por fim, aos demais amigos e colegas que fiz no CEMM, que também compartilharam comigo as alegrias e frustrações dessa jornada. Em especial, Carlos Eduardo, Charline Melo, Jonathas Sales, Juliana Pereira, Kylvia Silva, Lauro Perdigão, Livia Gurgel, Manoel Paiva Neto, Rosana Serpa e Sabrina Tainah, por inúmeras vezes transformarem os momentos de trabalho repetitivo e laborioso em exemplos de colaboração, apoio, incentivo e até descontração.

*“ Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, o homem que adquire conhecimento;
porque é melhor a sua mercadoria do que artigos de prata,
e maior o seu lucro que o ouro mais fino. Mais preciosa é do que os rubis,
e tudo o que mais possas desejar não se pode comparar a ela.”*

Salomão, Provérbios 3:13-15

RESUMO

Os fungos dimórficos *Coccidioides* spp. e *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, são os agentes causadores da coccidioidomicose e da histoplasmose, respectivamente, sendo capazes de acometer o homem e outros animais. A genética das populações *H. capsulatum* var. *capsulatum* têm sido caracterizadas mundialmente. Contudo, para *Coccidioides* spp. ainda há escassez de estudos de variabilidade genética, especialmente em isolados do Brasil. De modo geral, a terapia antifúngica contra essas micoses é efetiva, embora em quadros crônicos ou disseminados, o tratamento seja muitas vezes, prolongado e difícil de tolerar. Ademais, casos refratários e recidivos já foram descritos. Recentemente, foi demonstrada a capacidade de *H. capsulatum* de formar biofilme. Pouco se sabe sobre qual o papel desse mecanismo na patogênese da histoplasmose e nenhum relato sobre a sensibilidade à antifúngicos de *H. capsulatum* em biofilme, foi descrito até o momento. Na busca por novos compostos com atividade antifúngica, o sesquiterpeno farnesol tem se destacado por seu efeito inibitório sobre o crescimento de bactérias e fungos. Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo realizar a caracterização molecular de isolados brasileiros de *C. posadasii*, bem como, determinar o efeito *in vitro* do farnesol ante aos fungos dimórficos *C. posadasii* e *H. capsulatum* var. *capsulatum*, avaliando sua atuação sobre o crescimento fúngico, sensibilidade aos antifúngicos, permeabilidade celular, produção de ergosterol e sobre o crescimento em biofilme. Para tanto, cepas de *C. posadasii* foram avaliadas por meio das técnicas de RAPD e M13-*fingerprinting*. O método de macrodiluição foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de farnesol isolado em combinações com antifúngicos. *C. posadasii* também foi submetido a quantificação do ergosterol após a exposição a concentrações sub-inibitórias de farnesol. Ademais, a atividade do farnesol ante *C. posadasii* também foi avaliada na presença de estresse osmótico, induzido por adição de NaCl ao meio de cultura, durante os ensaios de sensibilidade. Por fim, cepas de *H. capsulatum* foram avaliadas na fase filamentosa e na fase leveduriforme, pelo método de microdiluição com farnesol isolado e em combinação com antifúngicos. A sensibilidade antifúngica destas drogas também foi avaliada ante *H. capsulatum* sob a forma de biofilme. Os resultados de RAPD e M13-*fingerprinting* mostraram perfis eletroforéticos semelhantes, mostrando poucos polimorfismos entre os isolados. O farnesol exibiu valores de CIMs baixos, variando de 0,0078- 0,0616 μM para *C. posadasii* e de 0,0078- 0,0312 para *H. capsulatum*. As combinações de farnesol com antifúngicos mostraram efeitos sinérgicos ($\text{FICI} \leq 0,5$) em ambas as espécies. A quantificação de ergosterol, mostrou que a exposição a concentrações sub-inibitórias de farnesol diminuiu a quantidade de ergosterol extraído das células fúngicas e CIM's mais baixos foram encontrados para o farnesol quando as cepas foram submetidas a estresse osmótico, indicando que esse composto atua na membrana fúngica. As combinações de farnesol com itraconazol e com anfotericina B apresentaram as maiores porcentagens de redução do crescimento fúngico em biofilme. Em conclusão, o farnesol apresentou resultados promissores como agente antifúngico ante *C. posadasii* e *H. capsulatum*, apresentando também ação adjuvante aumentando a sensibilidade aos antifúngicos *in vitro*. Ademais, este estudo contribuiu para caracterização do perfil de sensibilidade do biofilme de *H. capsulatum in vitro*, bem como para caracterização genética dos isolados de *C. posadasii* do Brasil.

Palavras-chave: *C. posadasii*, polimorfismo, farnesol, *H. capsulatum*, biofilme, sensibilidade.

ABSTRACT

Dimorphic fungi *Coccidioides* spp. and *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* are the causative agents of coccidioidomycosis and histoplasmosis, respectively, being able to affect humans and other animals. The population genetics of *H. capsulatum* var. *capsulatum* have been characterized worldwide. However, there are few studies of genetic variability for *Coccidioides* spp., especially in isolates from Brazil. In general, antifungal therapy is effective against these mycoses, although in chronic or disseminated cases, the treatment is often prolonged and difficult to tolerate. Moreover, recurrence and refractory cases have been reported. Recently, it was demonstrated that *H. capsulatum* is able to form biofilm. Little is known about the role of this mechanism in the pathogenesis of histoplasmosis and no report on the antifungal susceptibility of *H. capsulatum* in biofilm was described to date. In search for new compounds with antifungal activity, the sesquiterpene farnesol has gained prominence for their inhibitory effect on the growth of bacteria and fungi. Considering the above, this study aimed to perform molecular characterization of Brazilian isolates of *C. posadasii*, as well as, to determine the *in vitro* effect of farnesol against dimorphic fungi *C. posadasii* and *H. capsulatum* var. *capsulatum*, assessing its effect on fungal growth, sensitivity to antifungal agents, cell permeability, production of ergosterol and in biofilm growth. Thus, strains of *C. posadasii* were evaluated using the techniques of RAPD, M13-fingerprinting. Macrodilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of farnesol alone and in combination with antifungals. *C. posadasii* was also subjected to quantification of ergosterol after exposure to sub-inhibitory concentrations of farnesol. In addition, farnesol activity against *C. posadasii* was also evaluated in the presence of osmotic stress induced by the addition of NaCl to the culture medium during the susceptibility test. Finally, *H. capsulatum* strains were evaluated in filamentous and yeast phase by microdilution method with farnesol alone and in combination with antifungals. The antifungal susceptibility of these drugs was also evaluated against *H. capsulatum* in a biofilm. The results of RAPD and M13-fingerprinting showed similar electrophoretic profiles, showing few polymorphisms among the isolates. Farnesol exhibited low MIC values, ranging from 0.0078 to 0.0616 μM for *C. posadasii* and 0.0078 to 0.0312 μM for *H. capsulatum*. Combinations of farnesol with antifungal showed synergistic effects ($\text{FICI} \leq 0.5$) in both species. Quantification of ergosterol showed that exposure to sub-inhibitory concentrations of farnesol decreased the amount of ergosterol extracted from fungal cells and MIC's lower been found to farnesol when the strains were subjected to osmotic stress, indicating that this compound acts on the membrane fungal. Combinations of farnesol with itraconazole and amphotericin B showed the highest reduction percentages of fungal growth in biofilm. In conclusion, farnesol drug showed promising results as antifungal agent against *C. posadasii* and *H. capsulatum*, presenting adjuvant action and increasing sensitivity to antifungal agents *in vitro*. Furthermore, this study contributes to the characterization of the sensitivity profile of the biofilm of *H. capsulatum in vitro* as well as for genetic characterization of isolates of *C. posadasii* from Brazil.

Key-words: *C. posadasii*, polymorphism, farnesol, *H. capsulatum*, biofilm susceptibility.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GÊNEROS <i>COCCIDIOIDES</i> E <i>HISTOPLASMA</i>	18
1.1.1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	18
1.1.2 MORFOLOGIA.....	18
1.1.3 TRANSIÇÃO DIMÓRFICA <i>IN VITRO</i>	20
1.1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA	21
1.1.5 ANÁLISE MOLECULAR	24
1.1.6 FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	26
1.1.7 ASPECTOS ECOLÓGICOS.....	28
1.2 ASPECTOS GERAIS: COCCIDIOIDOMICOSE E HISTOPLASMOSE.....	30
1.2.1 EPIDEMIOLOGIA	30
1.2.2 PATOGÊNESE E IMUNOLOGIA.....	32
1.2.3 QUADROS CLÍNICOS.....	35
1.2.4 DIAGNÓSTICO	37
1.2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	37
1.2.5.1 Técnicas Micológicas	37
1.2.5.2 Técnicas Histopatológicas	41
1.2.5.3 Técnicas Imunológicas	42
1.2.5.4 Técnicas Moleculares	44
1.3 AGENTES ANTIFÚNGICOS E SUA CORRELAÇÃO COM <i>H. CAPSULATUM</i> E <i>COCCIDIOIDES</i> SPP.	45
1.3.1 DROGAS ANTIFÚNGICAS CLÁSSICAS E TESTE DE SENSIBILIDADE <i>IN VITRO</i>	46
1.3.2 GENERALIDADES SOBRE O SESQUITERPENÓ FARNESOL	54
1.3.3 ÍNDICE DE COMBINAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONÁRIA E SUA CORRELAÇÃO COM SINERGISMO E ANTAGONISMO DE DROGAS	57
2. PERGUNTAS DE PARTIDA	59
3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	59
4. OBJETIVOS.....	60
4.1 OBJETIVO GERAL.....	60
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
5. MATERIAIS E MÉTODOS	61

5.1 MICRORGANISMOS	61
5.2 BIOSSEGURANÇA	61
5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>C. POSADASII</i>	61
5.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	61
5.3.2 RAPD-PCR.....	62
5.3.3 M13-PCR <i>FINGERPRINTING</i>	62
5.4. FARNESOL E AGENTES ANTIFÚNGICOS	63
5.5 EFEITO INIBITÓRIO <i>IN VITRO</i> DE FARNESOL ANTE <i>C. POSADASII</i>	63
5.5.1 TESTE DE SENSIBILIDADE	63
5.5.1.1 Inóculo Fúngico	64
5.5.1.2 Ensaio de Macrodiluição	64
5.5.1.3 Determinação de CIM e FICI	65
5.5.4 FARNESOL E A CONCENTRAÇÃO DE ERGOSTEROL	65
5.5.5 FARNESOL NA PRESENÇA DE ESTRESSE OSMÓTICO.....	66
5.6 EFEITO INIBITÓRIO <i>IN VITRO</i> DE FARNESOL ANTE <i>H. CAPSULATUM</i>	66
5.6.1 TESTE DE SENSIBILIDADE	66
5.6.1.1 Inóculo Fúngico	67
5.6.1.2 Ensaio de Microdiluição	67
5.6.1.3 Determinação de CIM e FICI	68
5.6.2 FORMAÇÃO DE BIOFILME	68
5.6.2.1 TESTE DE SENSIBILIDADE EM BIOFILME	68
6. RESULTADOS	70
6.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>C. POSADASII</i>	70
6.2 EFEITO INIBITÓRIO <i>IN VITRO</i> DE FARNESOL ANTE <i>C. POSADASII</i>	70
6.2.1 TESTE DE SENSIBILIDADE	70
6.2.2 QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL.....	71
6.2.3 ESTRESSE OSMÓTICO.....	72
6.3 EFEITO INIBITÓRIO <i>IN VITRO</i> DE FARNESOL ANTE <i>H. CAPSULATUM</i>	73
6.3.1 TESTE DE SENSIBILIDADE	73
6.3.2 BIOFILME	73
7. DISCUSSÃO	75
8. CONCLUSÕES	83
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

APÊNDICES	102
APÊNDICE A – Relação dos isolados de <i>C. posadasii</i> incluídos no estudo.....	103
APÊNDICE B – Relação dos isolados de <i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> incluídos no estudo.....	104
APÊNDICE C – Valores de CIM e FICI para as drogas farnesol, itraconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B, isoladas e em combinação frente a cepas de <i>C. posadasii</i>	105
APÊNDICE D – Quantificação de ergosterol de cepas de <i>C. posadasii</i> após exposição a diferentes concentrações de farnesol	107
APÊNDICE E – Concentração Inibitória Mínima obtida para farnesol frente a cepas de <i>C. posadasii</i> na presença e ausência do estresse osmótico	109
APÊNDICE F – Valores de CIM e FICI para as drogas farnesol, itraconazol, e anfotericina B, isoladas e em combinação frente a cepas de <i>H. capsulatum</i>	110
APÊNDICE G – Absorbância (590 nm) do biofilme de <i>H. capsulatum</i> exposto às drogas farnesol, itraconazol e anfotericina B, isoladas e em combinação	112

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspecto micromorfológico de *Coccidioides* spp. (A e B) e *H. capsulatum* (C e D). A. Fase filamentosa, mostrando artroconídios e células disjuntoras; B. Fase leveduriforme, evidenciando uma esférula madura com numerosos endósporos; C. Fase filamentosa, mostrando macroconídios tuberculados; B. Fase leveduriforme, evidenciando leveduras ovais e arredondadas. 19
- Figura 2.** Aspecto morfológico do biofilme de *Coccidioides* spp (A) e *H. capsulatum* (B). A. imagem mostra hifas retiradas da ponta do cateter ventrículo-peritoneal, fixadas em formalina e coradas com calcoflúor. As setas mostram artroconídios intercalados por células disjuntoras (400x); B. Microscopia eletrônica, evidenciando o biofilme maduro após incubação *in vitro* durante 72 h a 37 °C. As setas indicam células leveduriformes ligadas por uma matriz exopolimérica 27
- Figura 3.** Mapa de distribuição das zonas endêmicas de coccidioidomicose e de histoplasmoses. As áreas destacadas em Amarelo correspondem às zonas endêmicas de coccidioidomicose e a seta indica a região de ocorrência de *C. immitis*, restrita à região da Califórnia, nos Estados Unidos. As áreas destacadas em vermelho correspondem a zonas endêmicas da histoplasmoses e as regiões em rosa, casos autóctones comprovados de infecção por *H. capsulatum*. As áreas em laranja correspondem a zona de sobreposição endêmica de ambas as micoses..... 31
- Figura 4.** (A) Ciclo biológico de *Coccidioides* spp., evidenciando a fase saprofítica no ambiente [1-3] e a fase parasitária após a sua inalação por um hospedeiro susceptível [4-8]. (B) Ciclo biológico de *H. capsulatum*, evidenciando a fase saprofítica no ambiente [1-2] e a fase parasitária após a sua inalação por um hospedeiro susceptível [3-6] (<http://www.cdc.gov/>)..... 34
- Figura 5.** A. Exame direto de escarro em preparação com KOH 30%, mostrando uma esférula de *C. posadasii* repleta de endósporos; B. Esfregaço de creme leucocitário corado com Giemsa, mostrando leveduras intracelulares de *H. capsulatum*. 38

Figura 6. Aspecto macromorfológico da fase filamentosa de <i>C. posadasii</i> (A) e <i>H. capsulatum</i> (B), após 15 dias de incubação a 28 °C, em ágar Batata, evidenciando colônias de cor branca de textura algodoadosa	39
Figura 7. Aspecto macroscópico de <i>H. capsulatum</i> na fase de levedura, após 15 dias de incubação a 35 °C em diferentes meios de cultura, evidenciando colônias de textura cremosa, de cor bege, com superfície lisa ou rugosa. A e B. Sabouraud e BHI suplementado com 10% de sangue de carneiro, respectivamente; C e D. Sabouraud e BHI com 1% de glicose, respectivamente	40
Figura 8. Aspecto histopatológico de <i>Coccidioides</i> spp. em biópsias de camundongo, evidenciando esférulas maduras contendo um grande número de endósporos, coradas por Grocott-Gomori (A) e PAS (B); Aspecto histopatológico de <i>H. capsulatum</i> em biópsias humanas, mostrando células leveduriformes coradas por Grocott-Gomori (C) e PAS (D).....	41
Figura 9. Desenho esquemático evidenciando o mecanismo de ação dos antifúngicos: anfotericina B, azólicos e equinocandinas.....	47
Figura 10. Farnesil pirofosfato como um ponto de ramificação na cadeia metabólica de lipídios.....	55
Figura 11. Determinação do Índice de Combinação Inibitória Fracionária.	57
Figura 12. Gel de agarose 2% mostrando o padrão de RAPD (A) e M13 <i>fingerprinting</i> (B) obtido de 8 isolados de <i>C. posadasii</i> (M: marcador de peso molecular 100pb; Colunas 1. CEMM 05-2-064; 2. CEMM 05-2-065; 3. CEMM 05-2-066; 4. CEMM 05-2-067; 5. CEMM 05-2-069; 6. CEMM 01-6-085; 7. CEMM 01-6-101; 8. CEMM 01-6-103).....	70
Figura 13. Quantificação do ergosterol em cepas de <i>C. posadasii</i> após a exposição a diferentes concentrações de farnesol. Legenda: Farnesol µM (1 - 0,0156; 2 - 0,0078; 3 - 0,0039; 4 - 0,0019; 5 - 0,00048; 6 - 0,00024; 7 -0,00012); Itraconazol mg/L (1 - 0,0125; 2 - 0,0625; 3 - 0,0312; 4 - 0,0156; 5 - 0,0078; 6 - 0,0039; 7 - 0,00195).	72

Figura 14. Os valores da Concentração Inibitória Mínima obtidos para farnesol frente a cepas de *C. posadasii* na presença e ausência do estresse osmótico. 72

Figura 15. Inibição do crescimento em biofilme, baseada na média geométrica da absorvância de cepas de *H. capsulatum* ante as drogas isoladas farnesol (FOH), anfotericina B (AMB) e itraconazol (ITR) e as combinações de farnesol com anfotericina B (FOH + AMB) e itraconazol (FOH + ITR) 74

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores de CIM e FICI para farnesol e os antifúngicos itraconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B, isolados e em combinação frente a cepas de *C. posadasii*. 71
- Tabela 2.** Valores de CIM e FICI para farnesol e os antifúngicos itraconazol e anfotericina B, isolados e em combinação frente a cepas de *H. capsulatum*. 73

LISTA DE ABREVIATURAS

AMB	Anfotericina B
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CEMM	Centro Especializado Em Micologia Médica
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CF	<i>Complement Fixation</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DL ₅₀	Dose Letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EIA	<i>Enzyme Immunoassay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLC	Fluconazol
FOH	Farnesol
HE	Hematoxilina-Eosina
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IMDF	Imunodifusão
INF- γ	Interferon-gama
iNOS	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
ITR	Itraconazol
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
KOH	Hidróxido de Potássio
MSDS	<i>Material Safety Data Sheet</i>
NB3	Nível de Biossegurança 3
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
rDNA	Ácido Desoxirribonucléico ribossômico
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>

RNA	Ácido Ribonucléico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
Th-1	<i>T-helper1</i>
Th-2	<i>T-helper2</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará
VRZ	Voriconazol

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GÊNEROS *COCCIDIOIDES* E *HISTOPLASMA*

1.1.1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

A Ordem Onygenales, está contida na Classe Eurotimycetes uma das quais compõe o Filo Ascomycota, pertencente ao Reino Fungi. Esta Ordem tem grande importância médica, uma vez que, inclui fungos considerados patógenos primários capazes de causar doenças mesmo em hospedeiros imunocompetentes e apresentam aspectos bioquímicos e morfológicos que lhe permitem escapar das defesas do sistema imune, tais como, os fungos dimórficos dos gêneros *Coccidioides* e *Histoplasma*. Estes patógenos são considerados uns dos mais virulentos e infectantes do grupo dos fungos (UNTEREINER et al., 2004; COX; MAGEE, 2004)

Atualmente, as espécies *Coccidioides immitis* e *Coccidioides posadasii*, agentes causadores da coccidioidomicose são as únicas espécies incluídas no gênero *Coccidioides*. pertencente à Família Onygenacea (FISHER et al., 2002). Quanto ao gênero *Histoplasma*, compreendido na Família Ajellomycetaceae, temos a espécie *Histoplasma capsulatum*, cujo teleomorfo é denominado *Ajellomyces capsulatus* (UNTEREINER et al., 2004) e apresenta três variedades: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii*, patogênicas ao homem, causadoras da histoplasmose clássica e africana, respectivamente; e *H. capsulatum* var. *farciminosum*, causadora de linfangite epizoótica em equinos (KASUGA et al., 2003). O presente estudo, tem enfoque na variedade *H. capsulatum* var. *capsulatum* a qual será citada apenas como *H. capsulatum*, a partir deste momento.

1.1.2 MORFOLOGIA

Coccidioides spp. e *H. capsulatum* são fungos dimórficos térmicos, que na natureza e em meios de cultura artificiais, a uma temperatura de 25°C a 30°C, apresentam-se na forma filamentosa, fase saprofítica ou infectante do ciclo biológico destes patógenos. Na fase parasitária, quando em contato com um hospedeiro ou quando cultivados, *in vitro*, em meios artificiais adequados, à temperaturas próximas de 37°C, estes agentes sofrem mudanças morfológicas, evoluindo para forma leveduriforme (WELSH et al., 2004; CRUZ, 2013).

Coccidioides spp. apresentam micélio formado por hifas finas, hialinas e septadas, que originam artroconídios, estruturas de reprodução assexuada, que medem de 2-4 μm por 3-6 μm , intercalados por células estéreis, desprovidas de material citoplasmático, denominadas disjuntoras (Figura 1A) Na maturação, os artroconídios infectantes são liberados e os restos das células disjuntoras são vistos nas extremidades dos artroconídios individuais, tal característica é responsável por sua fácil veiculação aérea (BRANDT; WARNOCK, 2007; COX; MAGEE, 2004). A forma de levedura é conhecida por esférula, grandes estruturas arredondadas de paredes espessadas, que medem 20 até 200 μm de diâmetro quando maduras. Cada esférula produz um grande número de pequenos endósporos em seu interior que medem de 2-4 μm de diâmetro (Figura 1B). (SABOULLE et al., 2007).

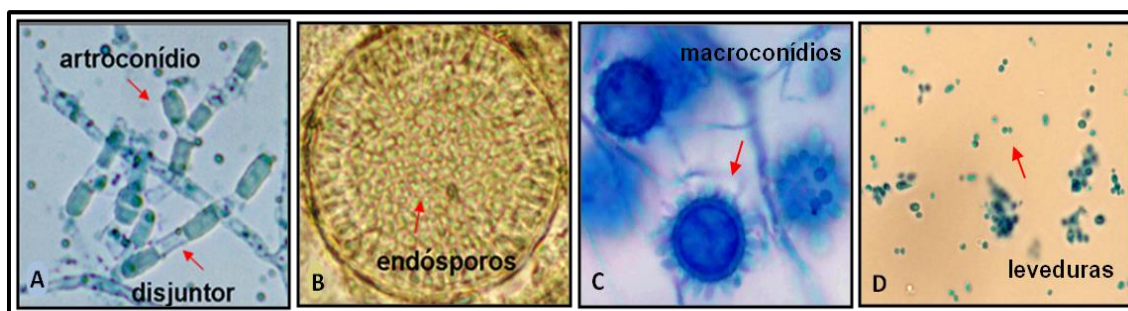


Figura 1. Aspecto micromorfológico de *Coccidioides* spp. (A e B) e *H. capsulatum* (C e D). A. Fase filamentosa, mostrando artroconídios e células disjuntoras; B. Fase leveduriforme, evidenciando uma esférula madura com numerosos endósporos. Fonte Cordeiro, 2006; C. Fase filamentosa, mostrando macroconídios tuberculados; B. Fase leveduriforme, evidenciando leveduras ovais e arredondadas. Fonte: Caetano, 2010.

A forma filamentosa de *H. capsulatum* apresenta micélio composto por hifas hialinas, septadas e ramificadas, com dois tipos de conídios como estruturas de propagação. Os microconídios que são estruturas ovaladas, com paredes lisas, medindo em torno de 2 μm a 4 μm , devido a seu diminuto tamanho são facilmente dispersos no ar, sendo considerados os principais propágulos infectantes deste fungo (KAUFFMAN, 2006). Os macroconídios, também denominados corpos mamilonados ou macroconídios tuberculados, são estruturas arredondadas, que possuem parede espessa, cobertos por projeções espiculadas e medem em torno de 8 μm a 15 μm (Figura 2A). (KAUFFMAN, 2006; AIDÉ, 2009; FERREIRA; BORGES, 2009). A forma leveduriforme apresenta células ovais uninucleadas e pequenas, medindo cerca de 3 a 5 μm de diâmetro (Figura 2B) (AIDÉ, 2009; FERREIRA; BORGES, 2009).

1.1.3 TRANSIÇÃO DIMÓRFICA *IN VITRO*

A conversão em *in vitro* de fungos dimórficos é importante para a realização de estudos que caracterizem a fase parasitária desses patógenos, sendo também relevante aos testes de sensibilidade antifúngica, onde a fase leveduriforme e a fase filamentosa podem apresentar diferenças significativas nos resultados obtidos (BRILHANTE et al., 2010). Para a transição de morfológica *in vitro* dos fungos dimórficos térmicos como *Coccidioides* spp. e *H. capsulatum* a temperatura apesar de fator fundamental, não é o único fator determinante para a conversão micélio-levedura. Outros fatores químicos e físicos, tais como, a presença de certos fatores nutricionais, aminoácidos, vitaminas, além de condições apropriadas de oxigênio e dióxido de carbono também estão diretamente envolvidos nesse processo (WOODS, 2002).

De modo geral, a conversão *in vitro* desses patógenos é um processo difícil e laborioso, sendo extremamente importante o uso de meios de cultura apropriados e condições ambientais adequadas. Vários estudos mostram que a fase leveduriforme de *Coccidioides* spp. não é facilmente obtida *in vitro*. O uso de meios sintéticos suplementados, com o dispersante N-Tamol (LONES; PEACOCK, 1960; PETKUS et al., 1985) e aminoácidos aromáticos, tais como, fenilalanina, tirosina e triptofano mostraram-se relevantes na conversão de fases e na maturação das esférulas e endósporos *in vitro*. A incubação a temperaturas próximas de 40 °C em atmosfera contendo 20% de CO₂ também é fortemente recomendada (BRESLAU; KUBOTA, 1964; SUN; HUPPERT; VUKOVICH, 1976).

A conversão *in vitro* de *H. capsulatum* parece ser mais facilmente obtida e a fase leveduriforme tem sido bastante utilizada em estudos de sensibilidade a antifúngicos (BRILHANTE et al., 2010; CORDEIRO et al., 2011). Para tanto, diferentes meios de cultura têm sido descritos, a maioria deles apresenta composição complexa, sendo enriquecidos com diversos nutrientes tais como, os aminoácidos, cisteína, ácido aspártico e ácido glutâmico; e vitaminas, como a tiamina (CASTELUCCI et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2006; SUARÉZ-ALVAREZ et al., 2010). A suplementação desses meios com sangue tem sido rotineiramente utilizada, uma vez que as substâncias contidas no plasma sanguíneo (vitaminas, eletrólitos, glicose, lípidos) mostram-se apropriadas para facilitar e aumentar a taxa de conversão de cepas de *H. capsulatum* (RIBEIRO, 2012). A incubação a uma temperatura de 35 a 37 °C (GUIMARÃES et al

2008; SUÁREZ-ALVAREZ et al., 2010) e a realização de subculturas semanais, também é recomendada (RIBEIRO, 2012).

Os estudos moleculares têm demonstrado que a transição morfológica em *H. capsulatum* é governada por dois reguladores transcricionais: os genes histidina quinase (*DRK1*) e *ryp1*. O papel desses genes é relacionado ao controle da transição morfológica da fase filamentosa para a fase leveduriforme sendo relatados como essenciais ao processo de conversão (HOLBROOK; RAPPLEYE, 2008). Nguyen, Sil (2008) demonstraram que um mutante no qual o gene *ryp1* foi bloqueado não mostrou crescimento leveduriforme mesmo quando submetido à temperatura de 37°C, em condições adequadas (NGUYEN; SIL, 2008).

1.1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os agentes fúngicos *Coccidioides* spp. e *H. capsulatum* são considerados patógenos primários, pois são capazes de colonizar um hospedeiro imunocompetente, encontrando nicho microambiental com substratos nutricionais suficientes para sobreviverem e se multiplicarem, além de conseguirem evitar ou subverter os mecanismos de defesa imune. Ademais, estes dois patógenos possuem fatores de virulência que lhes permitem romper ativamente as defesas do hospedeiro que habitualmente bloqueiam o crescimento invasivo de outros microrganismos (MURRAY, 2010a).

O dimorfismo apresentado pelas espécies *Coccidioides* spp e *H. capsulatum* é considerado um dos fatores de virulência mais relevantes na patogenicidade de todos os fungos dimórficos. O estabelecimento destes patógenos no hospedeiro depende diretamente da conversão da fase filamentosa para a fase parasitária leveduriforme (NEMECEK; WÜTHRICH; KLEIN, 2006). Essa transição de fases não resulta apenas em uma mudança morfológica da célula, mas também em uma alteração na composição da parede celular, nas moléculas antigênicas, bem como, na expressão de genes relacionados a mecanismos de virulência. Assim, em resposta a altas temperaturas e outras condições adversas que encontram no ambiente do hospedeiro, estes patógenos expressam vários genes específicos da fase leveduriforme (KLEIN, TEBBETS, 2007).

Um dos principais fatores de virulência específico de *Coccidioides* spp. é a produção de um antígeno imunodominante, a glicoproteína SOWgp que é depositada na

parede externa das esférulas. A exposição do hospedeiro à SOWgp modula a resposta imune, de forma tendenciosa na via Th2. A persistência de uma resposta imune à infecção, cujo equilíbrio é deslocado no sentido desta via, oferece uma vantagem para o patógeno por gerar o comprometimento da imunidade celular no hospedeiro (HUNG; XUE; COLE, 2007). Em contrapartida, uma metaloproteinase (Mep1) secretada durante a diferenciação dos endósporos digere a superfície celular da esférula levando a uma depleção do antígeno imunodominante (SOWgp), visando impedir o reconhecimento de endósporos livres pelo sistema imune do hospedeiro durante a sua fase de desenvolvimento, quando estão mais vulneráveis às células fagocíticas (HUNG et al., 2005).

Outros fatores de virulência relatados em *Coccidioides* spp., incluem a indução da produção de níveis elevados de arginase I pelo hospedeiro e urease pelo microrganismo, que contribuem causando dano nos tecidos do local de infecção. A arginase I concorre nos macrófagos com iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*) por um substrato em comum, a L-arginina, e, assim, reduz concentração de óxido nítrico, levando ao aumento da síntese de ornitina e uréia no hospedeiro. Os derivados de L-ornitina promovem o crescimento e a proliferação do patógeno, pois gera um *pool* de monoaminas, que podem ser incorporadas e utilizadas pelas células parasíticas para a síntese de poliaminas (HUNG; XUE; COLE, 2007). Hung et al., em 2007, também sugerem que alta concentração de uréia nos locais da infecção, na presença de urease, produzida e liberada pelo patógeno, resulta na produção de amônia contribuindo para a alcalinização do microambiente aumentando a sobrevivência de *Coccidioides* sp. no ambiente hostil do hospedeiro (HUNG; XUE; COLE, 2007).

É interessante relatar, que em *Coccidioides* spp., também foram identificadas moléculas fúngicas funcionalmente semelhantes as integrinas, receptores do complemento e de hormônios sexuais de humanos. Esse mimetismo funcional permite que as moléculas do hospedeiro sejam utilizadas em benefício do próprio patógeno. Como foi observado com os hormônios femininos progesterona e 17- β -estradiol, que em concentrações fisiológicas aumentam a taxa de crescimento e maturação das esférulas, e conseqüentemente, a liberação dos endósporos. Por isso, a gravidez especialmente durante o terceiro trimestre, apresenta um grande fator de risco a coccidioidomicose disseminada (MURRAY, 2010a).

H. capsulatum, por sua vez, possui parede celular composta de galactomananos, considerado o principal polissacarídeo antigênico do patógeno (HOLBROOK, RAPPLEYE, 2008). Na fase filamentosa o β -1,3 glucano é predominante e participa no recrutamento de leucócitos e na regulação de mediadores inflamatórios, tais como, os leucotrienos e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α . (KUROKAWA et al., 1998). Contudo, na fase parasitária este agente fúngico, modifica a biossíntese de glucanos que compõem sua parede celular, levando a produção de uma camada de α -1,3 glucano. A presença α -1,3 glucano é um atributo especial da fase leveduriforme de *H. capsulatum* e é relacionado à patogenicidade e virulência da cepa por evitar a detecção do mesmo pelas células do sistema imune, interferindo na ativação da imunidade celular e permitindo sua permanência dentro dos fagolisossomos (RAPPLEYE; EISSENBERG; GOLDMAN, 2007). A proteína YPS3p, codificada pelo gene *yps-3*, também é encontrada como constituinte da parede da levedura *H. capsulatum*. Acredita-se que esta proteína participa na disseminação do fungo aos sítios extrapulmonares (HOLBROOK; RAPPLEYE 2008) assim, cepas que expressam o gene *yps-3* apresentam maior capacidade de causar histoplasose disseminada (BOHSE, WOODS, 2007).

Outros mecanismos inerentes a espécie *H. capsulatum*, está relacionado a sua capacidade de sobreviver e proliferar dentro do macrófago. Nesse microambiente, com concentrações de ferro limitadas, a aquisição de ferro é mediada pela produção de sideróforos associada ao gene *SIDI* (HILTY et al., 2011); pela redução do ferro através da enzima redutase férrica, bem como, pela liberação do ferro ligado a transferrina a partir de um pH ácido (WOODS et al., 2002), sem, no entanto, ativar as enzimas hidrolíticas do fagolisossomo (WOODS et al., 2003; LÓPEZ et al., 2006). Da mesma forma que ocorre com o ferro, as leveduras dentro do fagolisossomo devem apresentar um eficiente mecanismo para ligação e transporte de Ca^{2+} . Assim, na fase leveduriforme, *H. capsulatum* expressa o gene *CBP1* liberando grandes quantidades de uma proteína ligadora de cálcio, *CBP1* (*calcium-binding protein*), para o ambiente que as rodeia (MURRAY, 2010a).

Ademais, em *H. capsulatum*, a termotolerância que permite a sobrevivência e replicação do patógeno em temperatura mais elevadas, está relacionada à síntese de proteínas de choque térmico. A produção dessas proteínas, tal como a proteína 82 (HSP82), desempenha um papel importante tanto na adaptação a temperatura, quanto no

processo de conversão da fase filamentosa para a fase leveduriforme (BORKOVICH et al., 1989; HOLBROOK, RAPPLEYE, 2008). A proteína 60 (HSP60) é outra proteína de choque térmico descrita em *H. capsulatum*, que por sua vez atua uma molécula de adesão. A interação entre *H. capsulatum* a HSP60 e o receptor CR3 (CD11/CD18) dos macrófagos resulta na ingestão rápida da levedura permitindo que o microrganismo sobreviva e replique-se dentro das células hospedeiras (MIHU, NOSANCHUK, 2012).

1.1.5 ANÁLISE MOLECULAR

Atualmente, os métodos moleculares têm sido amplamente utilizados para estudar a biodiversidade dos fungos. A obtenção de dados através destas técnicas revelam resultados mais precisos relativos à identificação, taxonomia e filogenia (UNTEREINER et al., 2004; SHARPTON et al., 2009). Ademais, as diversas técnicas de biologia molecular também estão disponíveis para a detecção da variabilidade na sequência de DNA, dentro de uma mesma espécie. Assim, através da determinação de marcadores moleculares, isto é, por meio da detecção de polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados, pode-se avaliar a genética das populações, realizar o mapeamento epidemiológico, realizar inferências quanto à sistemática e filogenética das espécies, dentre outros (HIBBETT et al., 2007).

Com o aumento do número de casos de coccidioidomicose e de histoplasmose, tornou-se importante a realização de estudos que determinem o perfil molecular de cepas de *Coccidioides* spp e de *H. capsulatum*, visando à compreensão da distribuição de genótipos entre populações, para acompanhamento de surtos, variações na virulência e progressão das infecções. Assim, diferentes abordagens moleculares têm sido utilizadas, com objetivo de inferir questões relativas à epidemiologia da coccidioidomicose e da histoplasmose, e a caracterização da estrutura populacional das espécies *Coccidioides* spp e *H. capsulatum*, respectivamente (NEAFSEY et al., 2010; MUNIZ et al., 2010).

O primeiro trabalho referente ao estudo de populações de *Coccidioides* baseado em polimorfismos determinou uma estrutura populacional consistente com uma espécie predominantemente clonal, quando tratados com enzimas de restrição, evidenciando um mesmo padrão, em 13 dos 15 isolados analisados (ZIMMERMANN; SNEDKER; PAPPAGIANIS, 1994). Posteriormente, outros trabalhos analisando diferentes *loci* de

isolados de *Coccidioides* spp. foram descritos. Estes, por sua vez, determinaram o isolamento reprodutivo entre duas populações de *C. immitis*, agrupadas de acordo com sua origem geográfica (KOUFOPANOU et al., 1997; FISHER; WHITE; TAYLOR, 1999), as quais foram, em estudo posteriores, definidas como espécies filogenéticas diferentes, sendo denominadas de *C. immitis* e *C. posadasii*. (FISHER et al., 2002).

O uso de técnicas moleculares para caracterizar o padrão genético das cepas de *H. capsulatum* teve início em 1986, utilizando marcadores de RFLP. Os isolados de *H. capsulatum* foram agrupados com base em 3 perfis distintos: classe 1 foi constituída de uma cepa de *H. capsulatum* da América do Norte; classe 2, incluiu cepas norte-americanas e africanas, englobando maioria dos isolados; classe 3, por sua vez, foi composta de cepas isoladas da América Central e América do Sul. Mais recentemente, Kasuga et al., (2003) analisaram a relação filogenética entre 137 amostras representativas das 3 variedades de *H. capsulatum*, provenientes dos 5 continentes e observaram a existência 8 clados compostos por populações geográficas geneticamente distintas (KASUGA et al., 2003).

No Brasil, estudos têm demonstrado o perfil molecular de cepas de *H. capsulatum* circulantes (ZANCOPÉ et al., 2005; MUNIZ et al., 2010). Segundo Zancopé et al., (2005), cepas de *H. capsulatum* de diferentes regiões brasileiras foram agrupadas de acordo com a origem geográfica, através da técnica de RAPD-PCR. Nesse estudo citado, foram observados três *clusters*, que foram classificados em: *cluster* I (cepas de *H. capsulatum* pertencentes à região Nordeste), *cluster* II (cepas de *H. capsulatum* pertencentes à região Sul e Sudeste) e *cluster* III (cepas de *H. capsulatum* pertencentes à região Centro-Oeste). Estudos mais recentes, baseados no sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 mostraram que os isolados brasileiros são agrupados em um mesmo subclado e apesar de mostrarem similaridade genética com isolados de outros continentes, uma população genética distinta de cepas provenientes exclusivamente da cidade do Rio de Janeiro pôde ser observada (MUNIZ et al., 2010; BRILHANTE et al., 2012a)

Nesse contexto, é possível perceber que diferentemente de *H. capsulatum* cuja divergência genética entre as populações têm sido bem caracterizadas no Brasil e no mundo. Ainda há escassez de estudos que avaliem variações genéticas entre populações de *Coccidioides*, após a divisão das espécies, especialmente relacionados a isolados de

C. posadasii do Brasil e da América do Sul. Até o momento, os surtos da doença não têm sido correlacionados a genótipos mais virulentos resultantes da propagação de um único isolado clonal, mas causadas por uma diversidade de genótipos, sendo associados principalmente a fatores ambientais (SAUBOLLE; MCKELLAR; SUSSLAND, 2007; JEWELL; CHESHIER; CAGE, 2008).

Estudos recentes com base no sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2, mostraram baixa diversidade entre os isolados brasileiros de *C. posadasii*, e entre estes e os isolados de outras regiões do mundo, cujas sequências haviam sido previamente depositadas no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank). Pelo reduzido número de polimorfismos apresentado na região genômica avaliada no referido estudo, novos marcadores moleculares necessitam ser avaliados para confirmar a baixa variabilidade genética apresentada pela população brasileira de *C. posadasii* e aprimorar os conhecimentos sobre a genética e evolução deste patógeno no Brasil (LIMA, 2010).

1.1.6 FORMAÇÃO DE BIOFILME

De modo geral, os biofilmes proporcionam um nicho de proteção contra fatores ambientais agressivos, tais como, alterações de pH e osmolaridade, desidratação, exposição a predadores, agentes químicos, metais pesados, dentre outros (MITTELMAN, 1998). No hospedeiro o biofilme tem demonstrado um papel crítico no desenvolvimento de uma infecção, sendo considerado um importante fator de virulência (PHILLIPS; SCHULTZ et al., 2012). A associação microbiana em biofilme confere maior resistência contra mediadores específicos da resposta imune (FANNING; MITCHELL, 2012). Além disso, uma das principais consequências do modo crescimento em biofilme é o aumento da resistência aos agentes antimicrobianos, principal razão pela qual as infecções associadas a biofilme são muitas vezes refratárias a terapia antimicrobiana convencional (PATEL et al., 2005).

Atualmente, acredita-se que a maior parte das infecções microbianas no homem é causada por patógenos organizados em biofilmes. Por conseguinte, tem havido um grande interesse sobre a atuação dos biofilmes em doenças infecciosas. Biofilmes de fungos têm se mostrado um problema clínico crescente, associados à resistência a antifúngicos e com significativas taxas de mortalidade (PITANGUI et al., 2012). Muitos fungos clinicamente importantes produzem biofilmes, incluindo os gêneros *Candida*

(GANGULY; MITCHELL, 2011), *Aspergillus* (MÜLLER; SEIDLER; BEAUVAIS, 2011), *Cryptococcus* (MARTINEZ et al., 2008), *Pneumocystis* (CUSHION; COLLINS; LINKE, 2009) e *Trichosporon* (DI BONAVENTURA et al., 2006).

Quanto ao gênero *Coccidioides*, em 2002, foi relatado um caso recorrente de meningite coccidióica no qual a formação de biofilme associado a um tubo de derivação ventrículo peritoneal (DVP) foi apontado como o responsável por uma persistência de 4 anos da infecção, apesar do paciente após terapia inicial com anfotericina B, permanecer em tratamento de manutenção com dosagens adequadas de fluconazol (DAVIS; COOK; COSTERTON, 2002). Neste estudo, o biofilme de *Coccidioides* sp. descrito foi estruturalmente semelhante ao biofilme de *Candida* sp. que também apresentam hifas e leveduras envolvidas por uma matriz extracelular (Figura 2A). Apesar disso, *Coccidioides* sp. quando em parasitismo apresenta-se na forma leveduriforme, com raras exceções. A análise do líquido e da biopsia das meninges do paciente mostraram o patógeno sob a forma de esférulas, indicando que a inversão da fase leveduriforme para fase micélio no tubo de DVP foi dirigida pelo crescimento em biofilme. Ademais, o isolado de *Coccidioides* sp. demonstrou sensibilidade *in vitro* ao azólico fluconazol concluindo que o biofilme fúngico foi a causa para o insucesso ao tratamento com fluconazol (DAVIS; COOK; COSTERTON, 2002).

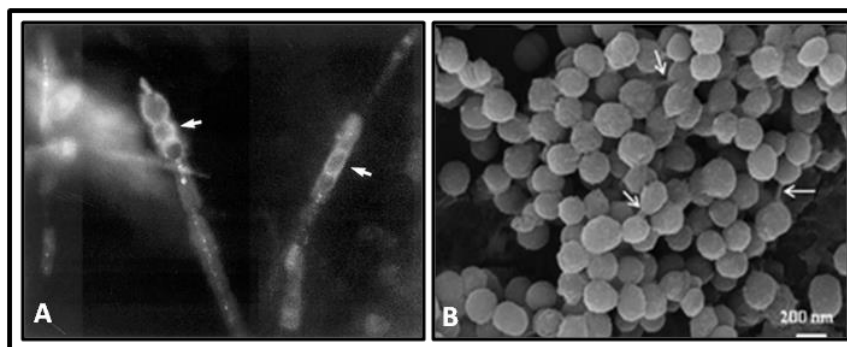


Figura 2. Aspecto morfológico do biofilme de *Coccidioides* spp (A) e *H. capsulatum* (B). A. imagem mostra hifas retiradas da ponta do cateter ventrículo-peritoneal, fixadas em formalina e coradas com calcoflúor. As setas mostram artroconídios intercalados por células disjuntoras (400x). Fonte: DAVIS, 2002; B. Microscopia eletrônica, evidenciando o biofilme maduro após incubação *in vitro* durante 72 h a 37 °C. As setas indicam células leveduriformes ligadas por uma matriz exopolimérica. Fonte: Pitangui, 2012.

Recentemente, foi demonstrado que a espécie *H. capsulatum*, também é capaz de formar biofilmes (Figura 2B). Este primeiro relato mostra o crescimento em biofilme de *H. capsulatum* na fase leveduriforme, *in vitro* e descreve uma possível associação

entre a capacidade deste patógeno formar biofilme e o padrão de adesão das leveduras em células epiteliais A549. Os pesquisadores também sugerem que a formação de biofilme pode estar relacionado a habilidade de *H. capsulatum* evitar sistema imunitário celular. No entanto, mais estudos são necessários para entender melhor o papel deste mecanismo na gravidade e patogênese da histoplasmose (PITANGUI et al., 2012).

Nenhum relato sobre a sensibilidade a agentes antifúngicos das espécies *Coccidioides* spp. e *H. capsulatum* sob a forma de biofilme foi descrito até o momento. Sendo de grande relevância a avaliação de um possível perfil de resistência antifúngica, uma vez que, outros patógenos fúngicos em biofilmes já demonstram um padrão de sensibilidade diferente quando comparados ao crescimento na forma planctônica (CHANDRA; MUKHERJEE; GHANNOUM, 2010).

1.1.7 ASPECTOS ECOLÓGICOS

Coccidioides spp. são fungos geofílicos que se desenvolvem em solos com elevada salinidade e pH alcalino, sendo habitualmente encontrados a uma profundidade entre 10 e 50 centímetros abaixo da superfície (LANIADO-LABORÍN, 2007a). São associados a regiões semi-áridas, com temperatura média acima de 30 °C, onde há áreas de elevadas temperaturas, secas recorrentes, e vegetação xerofítica pobre e esparsa (PAIXÃO et al., 2004). A sobrevivência destas espécies é substancialmente diminuída quanto em competição com outros microrganismos no solo (SAUBOLLE; MCKELLAR; SUSSLAND, 2007).

Vários estudos confirmam a importância das tocas de tatus na ecologia de *Coccidioides* spp. (CORDEIRO et al., 2006a; TOGASHI et al., 2009). No Brasil, muitos casos de coccidioidomicose estão relacionados ao hábito de escavar tocas de tatus, com destaque para espécie *Dasyus novemcinctus* considerada reservatório do patógeno (COSTA et al., 2001; EULÁLIO et al., 2001). O tatu é uma espécie de mamífero de hábitos fossoriais, bastante apreciado no Nordeste como alimento, os caçadores, a fim de capturar o animal em suas tocas, escavam o solo, ficando suscetíveis à inalação da dos artroconídios, produzidos durante a fase saprofítica de *Coccidioides* spp. (PEREIRA JUNIOR; JORGE; BAGAGLI, 2003). Além disso, Nos Estados Unidos, há relatos de casos de coccidioidomicose associado ao contato com tocas de roedores (DRUTZ; CATANZARO, 1978).

A fase saprofítica de *H. capsulatum* também é geofílica, contudo tem predileção por solos ricos de compostos nitrogenados, pH ácido e alta umidade, características encontradas em solos enriquecidos com fezes de alguns animais, como aves, morcegos ou pássaros. Estes solos são ricos em carboidratos, nitrogênio e fosfato que favorecem a sobrevivência do patógeno e inibem o crescimento de organismos competidores (ROSSINI; GOULART, 2006; KAUFFMAN, 2009). Desta forma, lugares como galinheiros, cavernas, grutas, ocos de árvores, casas abandonadas, parques e praças são locais passíveis de colonização por este fungo (LYON et al., 2004).

Os morcegos são suscetíveis à infecção e participam ativamente da epidemiologia da histoplasmose, por sua capacidade migratória, esses animais podem disseminar o patógeno de um local a outro, através da eliminação de formas viáveis do fungo nas fezes (ALLTON et al., 2010; WANKE; LAZÉRA, 2004). As aves raramente são acometidas provavelmente por apresentarem elevada temperatura corpórea, em torno de 41°C, porém acredita-se que podem carrear o microrganismo em suas asas, penas e bico (JULG et al., 2008; QUIST et al., 2011).

As características ecológicas de *Coccidioides* spp. e *H. capsulatum* são de relevante importância na identificação de fontes ambientais e atividades de risco relacionadas à aquisição da coccidioidomicose e da histoplasmose, respectivamente. Desta forma, atividades e profissões relacionadas a manipulação do solo de forma geral, parecem ser diretamente associadas com o desenvolvimento destas micoses. Atividades como, caçadas de tatu, trabalho agrícola e escavações arqueológicas, por exemplo, podem estar relacionadas com o desenvolvimento da coccidioidomicose, (VERAS et al., 2003; PAIXÃO; ROCHA; SIDRIM, 2004). Além disso, fenômenos naturais como furacões, terremotos e fortes ventanias, também podem estar associados (RESTREPO, 2006). Para histoplasmose, atividades como limpeza de sótãos ou celeiros, demolição de prédios antigos têm sido diretamente vinculados aos relatos da doença (KAUFFMAN, 2009). Ademais, de modo geral, microepidemias de histoplasmose estão associados a grupos de indivíduos expostos a ambientes como grutas habitadas por morcegos, galinheiros, pombais ou casas desabitadas (ROSSINI, GOULART, 2006).

1.2 ASPECTOS GERAIS: COCCIDIOIDOMICOSE E HISTOPLASMOSE

1.2.1 EPIDEMIOLOGIA

As espécies de *Coccidioides* são endêmicas das Américas, encontradas em uma faixa delimitada entre 40° de latitude norte e sul. A espécie *C. immitis* é restrita a região da Califórnia, Estados Unidos, enquanto a espécie *C. posadasii* apresenta maior distribuição, com ocorrência nas demais zonas endêmicas, incluindo outras cidades dos Estados Unidos, México, América Central e do Sul (Figura 3) (LANIADO-LABORÍN, 2007a). Apesar da caracterização geográfica destas duas espécies serem bem definidas, vários casos de coccidioidomicose causada por *C. immitis* fora de sua área endêmica vem sendo descritos (JEWELL; CHESHER; CAGE, 2008; CASTAÑÓN-OLIVARES et al., 2007).

A maior incidência de casos de coccidioidomicose tem sido observada nos Estados Unidos, onde várias zonas endêmicas já foram descritas, tais como, Nevada, Colorado, Arizona, Sudoeste da Califórnia, Novo México, Oeste do Texas e partes de Utah (DIXON, 2001). Continuamente ao sudeste dos Estados Unidos há vários focos ligados ao nordeste do México (CASTAÑÓN-OLIVARES et al., 2004). Outros países, como Guatemala, Honduras, Argentina, Paraguai, Bolívia, Colômbia e Venezuela também são considerados áreas endêmicas (LANIADO-LABORÍN, 2007a; BAPTISTA-ROSAS; HINOJOSA; RIQUELME, 2007).

No Brasil, a coccidioidomicose está associada a locais situados na zona semi-árida da região Nordeste, considerada uma das áreas endêmicas da doença na América do Sul. O mapa de distribuição geográfica da coccidioidomicose no país inclui quatro estados: Piauí (100 casos), Ceará (19 casos), Maranhão (6 casos) e Bahia (2 casos) (DEUS-FILHO, 2009). No Ceará, até 2010, 19 casos da doença já foram descritos, envolvendo pacientes procedentes de diferentes municípios: Aiuaba, Independência, Boa Viagem, Solonópoles, Catunda, Santa Quitéria, Arneiroz, Ibiapina, Sobral, Jaguaribe e Parambu (FECHINE, 2005; TOGASHI et al., 2009; CORDEIRO et al., 2010).



Figura 3. Mapa de distribuição das zonas endêmicas de coccidioidomicose e de histoplasmose. As áreas destacadas em Amarelo correspondem às zonas endêmicas de coccidioidomicose e a seta indica a região de ocorrência de *C. immitis*, restrita à região da Califórnia, nos Estados Unidos. As áreas destacadas em vermelho correspondem a zonas endêmicas da histoplasmose e as regiões em rosa, casos autóctones comprovados de infecção por *H. capsulatum*. As áreas em laranja correspondem a zona de sobreposição endêmica de ambas as micoses. Fonte: adaptado de Marques, 2009.

Diferentemente de *Coccidioides* spp. a espécie *H. capsulatum* apresenta distribuição ubiqüitária. Desta forma, a histoplasmose embora seja predominante no continente americano, apresenta ampla distribuição geográfica, tendo sido descrita em mais de 50 países (Figura 3). Apresenta várias zonas endêmicas ao longo das regiões centrais e sul dos Estados Unidos, sendo predominante nos vales dos rios Mississipi e Ohio. Na América Central, destacam-se as várias ilhas do Caribe, e países como México, Honduras, Guatemala, Nicarágua e Panamá. Na América do Sul, Venezuela, Colômbia, Peru, Argentina, Uruguai e Brasil também apresentam alta prevalência dessa micose. Casos esporádicos e autóctones de histoplasmose também têm sido relatados na África, Ásia e na Europa (ROSSINI, GOULART, 2006; FERREIRA; BORGES, 2009).

No Brasil, a histoplasmose vem sendo relatada em todas as regiões do país, onde casos clínicos autóctones são observados em episódios isolados, bem como, sob a forma de microepidemias (CHANG et al., 2007). Inquéritos epidemiológicos empregando testes cutâneos apontam as regiões do sul e sudeste como áreas de maior incidência da infecção (MORAIS et al., 2008). Várias microepidemias já foram registradas no país, envolvendo diferentes estados: Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo, Distrito Federal, Minas Gerais, Paraíba, Amazonas e Bahia (AIDÉ, 2009). Estudos mais

recentes revelaram a ocorrência de microfocos de histoplasmose nos Estados do Maranhão e Piauí (DEUS FILHO et al., 2009).

O número de casos de histoplasmose vem crescendo em várias regiões do Brasil. No Ceará, no período compreendido entre 1995 a 2004, a histoplasmose disseminada foi detectada em quase 44% dos pacientes HIV positivos (164 casos), apresentando alta taxa de mortalidade (DAHER et al., 2007). Posteriormente, no período de 2008 a 2009 mais 161 casos foram registrados (DAHER et al., 2006). Recentemente, de 2006 a 2010, foi relatado um total de 208 casos, todos associados a pacientes HIV positivos, provenientes de um hospital público de referência em Fortaleza (BRILHANTE et al., 2012b).

É importante ressaltar que, a real frequência dos casos de coccidioidomicose e histoplasmose no Brasil, é na verdade subestimada. Pois, embora estas doenças estejam incluídas a lista referente a casos de agregação ou surto e óbitos por agravo inusitado, a notificação dos casos ao Ministério da Saúde não é obrigatória, pois estas micoses não constam na lista de doenças de notificação compulsória nacional (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Ademais estas doenças mimetizam com outras doenças pulmonares mais populares, tal como a tuberculose, sendo desta forma, passíveis de um diagnóstico errôneo (KAUFFMAN, 2007; CORDEIRO et al., 2010).

1.2.2 PATOGÊNESE E IMUNOLOGIA

A coccidioidomicose e a histoplasmose são adquiridas através da inalação de conídios infectantes produzidos na fase filamentosa saprofítica dos fungos *Coccidioides* spp e *H. capsulatum*, respectivamente. No solo, os conídios desses patógenos, podem facilmente serem dispersos no ar e seguir por um dos seguintes caminhos: germinar e perpetuar o ciclo sapróbio ou serem inalados por um hospedeiro suscetível e iniciar o ciclo parasitário, convertendo para fase leveduriforme (Figura 5 e 6) (LANIADO-LABORÍN, 2007b).

Na coccidioidomicose, a resposta inicial do hospedeiro tem como alvo o artroconídio e se caracteriza por influxo de leucócitos polimorfonucleares, que respondem a substâncias quimiotáticas geradas em resposta a ativação do sistema complemento. Dentro das primeiras 72 horas, os artroconídios são convertidos para esférulas. As esférulas sofrem um processo elaborado de espessamento da parede e

compartimentação do citoplasma para formar múltiplos de minúsculos endósporos em seu interior (Figura 4A, [4-6]). A resposta inflamatória muda para uma infiltração de células mononucleares, que persiste em toda infecção acarretando a formação de granulomas (DICAUDO, 2006).

As esférulas quando maduras sofrem ruptura, liberando os endósporos, que por sua vez, sofrem crescimento isotrópico e maturam progressivamente. Assim, cada um dos endósporos atua como um novo agente infectante, crescendo e se diferenciando em uma nova esférula, que é novamente capaz de produzir de 200-300 endósporos, reiniciando o ciclo parasitário (Figura 4A, [7-8]) (HUNG; XUE; COLE, 2007). A liberação dos endósporos do interior das esférulas produz uma resposta transitória dos leucócitos polimorfonucleares, presumivelmente provocada por substâncias liberadas a partir da ruptura das esférulas (CHILLER et al., 2003). As esférulas maduras podem facilmente se evadir da fagocitose porque são grandes demais para serem ingeridas por neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Já os endósporos recém-liberados, esférulas imaturas são susceptíveis a fagocitose. Embora, os estudos *in vitro* das interações patógeno-hospedeiro sugiram que muitos sobrevivem (DRUTZ; HUPPERT, 1983), a participação das células T é efetiva na defesa frente *Coccidioides* spp..

Na histoplasmose, os conídios inalados chegam até os alvéolos pulmonares estimulando uma resposta inflamatória no hospedeiro, composta de células mononucleares e macrófagos. Após a conversão para a fase leveduriforme, liga-se a receptores (CD11/CD18) presentes na superfície dos macrófagos alveolares residentes, são então fagocitadas e posteriormente funde-se aos lisossomos. Desta forma, as leveduras sobrevivem e multiplicam-se dentro dos fagolisossomos (Figura 4B, [4]) (NEWMAN, 1999). Entre o décimo ou décimo oitavo dia após o início da infecção primária, a imunidade celular, tipo T *helper* 1 (Th1), que irá produzir interferon gama (IFN- γ) e outras citocinas, é ativada. A liberação destas citocinas ativam os macrófagos acarretando em uma reação granulomatosa seguida de cicatrização, fibrose e calcificação (ROSSINI; GOULART, 2006; FERREIRA; BORGES, 2009).

Quando não há essa barreira imunológica, o agente causador da histoplasmose pode ser transportado por via linfática até os linfonodos mediastinais e disseminar-se para outros órgãos e sistemas por via hematogênica, produzindo novos focos inflamatórios como fígado baço e medula óssea (Figura 4B, [4-6]). Os pacientes

imunodeprimidos apresentam a forma disseminada da doença, uma vez que não há uma reação inflamatória eficiente nem formação de granulomas compactos, que impeçam a disseminação do fungo. O tipo de resposta imune exibida pelos mesmos, é do tipo T *helper* 2 (Th2). Vale ressaltar que resposta imune celular, ao levar à cura da infecção primária, também torna os indivíduos resistentes às novas infecções (HENINGER et al., 2006; FERREIRA, BORGES, 2009). Caso contrário, o patógeno *H. capsulatum* pode permanecer latente durante muitos anos e reativar-se em caso de imunodepressão (ROSSINI; GOULART, 2006; FERREIRA; BORGES, 2009; KAUFFMAN, 2009).

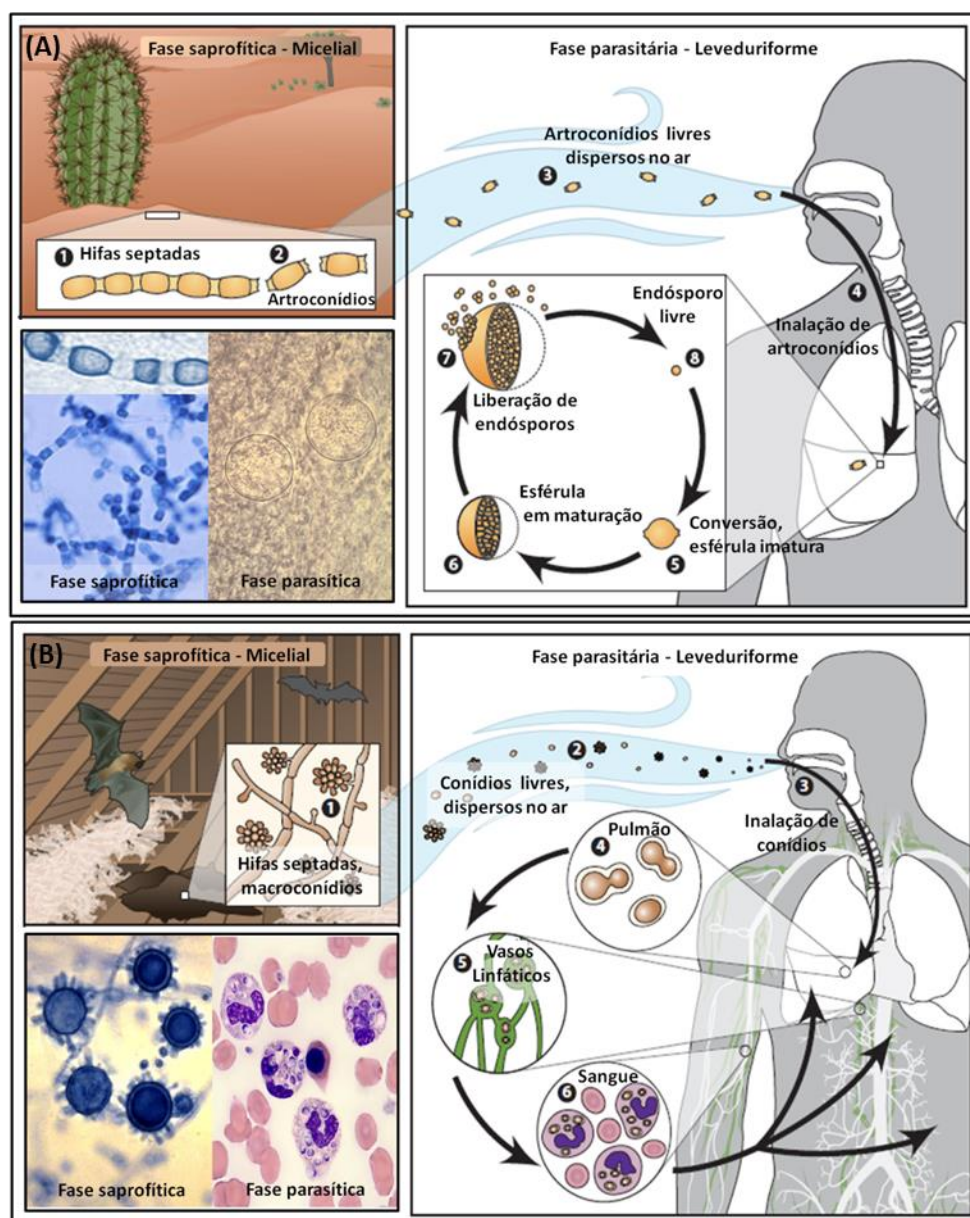


Figura 4. (A) Ciclo biológico de *Coccidioides* spp., evidenciando a fase saprofítica no ambiente [1-3] e a fase parasitária após a sua inalação por um hospedeiro susceptível [4-8]. (B) Ciclo biológico de *H. capsulatum*, evidenciando a fase saprofítica no ambiente (1-2) e a fase parasitária após a sua inalação por um hospedeiro susceptível (3-6). Fonte: CDC, com adaptações (<http://www.cdc.gov/>).

Portanto, é possível afirmar que os quadros clínicos de coccidioidomicose e de histoplasmoses dependem diretamente da resposta imune do hospedeiro, embora a quantidade de inóculo inalado e a virulência fúngica das cepas também sejam relevantes ((HUNG; XUE; COLE, 2007; FERREIRA, BORGES, 2009). Ademais, é importante salientar que a resposta imune via Th1, na qual há produção de interleucinas (IL-2, IL-12), TNF- α e IFN- γ mostra-se essencial para a defesa do hospedeiro frente *Coccidioides* spp e *H. capsulatum*, traçando um perfil de resistência a infecção por estes patógenos. Enquanto, a resposta imune via Th2, com liberação de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 pode ser correlacionada a um perfil de susceptibilidade ao desenvolvimento das referidas micoses (HATTON; WEAVER, 2003).

1.2.3 QUADROS CLÍNICOS

A coccidioidomicose e a histoplasmoses são doenças primariamente pulmonares, mas que podem apresentar um espectro de manifestações clínicas, bastante amplo. A gravidade e evolução dessas micoses serão determinadas pela quantidade de partículas inaladas, estado imunológico do hospedeiro e virulência da cepa infectante (COX; MAGEE, 2004; AIDÉ, 2009). Desta forma, estas infecções podem ser meramente assintomáticas ou permanecerem como uma infecção respiratória aguda e autolimitada, na maioria dos hospedeiros expostos, entretanto, em indivíduos susceptíveis também podem progredir em uma doença crônica e levar a disseminação atingindo outros órgãos e sistemas (COX; MAGEE, 2004; AIDÉ, 2009).

Nesse contexto, a coccidioidomicose manifesta-se sob três formas clínicas principais: forma pulmonar primária; forma pulmonar progressiva e forma disseminada (DEUS-FILHO, 2009). A infecção pulmonar primária é assintomática em 60% dos casos, onde os indivíduos infectados não apresentam sintomas ou o fazem sob forma indistinguível de uma infecção de trato respiratório superior (AVILES-SALAS; QUINTERO-CUADRA; CORNEJO-JUÁREZ, 2007). Quando apresentam manifestações de doença respiratória aguda, na qual intensidade dos sintomas variam desde um estado gripal até um quadro de uma grave infecção respiratória inespecífica. De modo geral, os sintomas são caracterizados por febre, tosse, dispnéia, dor torácica e quadros inespecíficos de gripe. Essa forma da coccidioidomicose geralmente regride espontaneamente para a cura em 30-60 dias, mesmo sem tratamento antifúngico (DEUS-FILHO, 2009).

Em alguns casos, sobretudo em pacientes diabéticos ou imunocomprometidos, a coccidioidomicose pulmonar aguda não regride, evoluindo para uma pneumonia crônica. Assim, a forma pulmonar progressiva é geralmente crônica e evolui a partir de infecções cujos sintomas não regrediram após dois meses. Estas formas podem apresentar-se como lesões nodulares ou cavitárias; doença pulmonar fibrocavitária; disseminação miliar pulmonar, com manifestações clínicas e radiológicas inespecíficas (DEUS-FILHO, 2009). A forma mais grave da doença é a disseminada que pode rapidamente atingir vários órgãos e sistemas, evoluindo de forma fatal quando não diagnosticada e tratada a tempo. No entanto, apenas aproximadamente 1-5% dos pacientes com a forma pulmonar primária evoluem com disseminação, sendo as lesões cutâneas a localização extrapulmonar mais comum. Lesões de disseminação também são usualmente observadas em ossos, articulações, sistema nervoso central, e no aparelho gênito-urinário (COX, MAGEE, 2004).

A histoplasmose por sua vez, pode ser clinicamente classificada em pulmonar aguda, pulmonar crônica ou disseminada (SEGURO; SILVEIRA, 2008). A doença pulmonar aguda é observada na maioria dos pacientes, dos quais cerca de 90 a 95% dos casos são assintomáticos, onde não se observa nenhum sinal clínico. Os casos sintomáticos se apresentam como quadros análogos a uma infecção respiratória viral. Um quadro pulmonar agudo mais grave também pode ser observado, especialmente quando há aspiração maciça de partículas infectantes do fungo. A sintomatologia mais frequente consiste em febre, calafrios, cefaléia, mialgias, tosse, dispnéia, dor torácica e prostração intensa. A palidez cutânea também é um sinal marcante. Os sintomas chegam a desaparecer após duas a quatro semanas, por regressão espontânea, sem necessidade de tratamento. (ROSSINI; GOULART, 2006; FERREIRA; BORGES, 2009; AIDÉ, 2009; KAUFFMAN, 2009).

A histoplasmose pulmonar crônica acomete especialmente indivíduos tabagistas, com mais de 50 anos de idade e portadores de doença pulmonar crônica obstrutiva (FERREIRA; BORGES, 2009). Quanto à sintomatologia clínica, inclui febre baixa, perda de peso, sudorese noturna, dor torácica e tosse com expectoração hemoptóica, quadro bastante semelhante ao observado na tuberculose pulmonar crônica, entretanto com menor gravidade (MUKHERJEE et al., 2010). A histoplasmose disseminada é a forma clínica mais grave da doença, ocorrendo a partir de focos extrapulmonares e extraganglionares mediastínicos de curso progressivo. A disseminação comumente

resulta em infiltração de linfonodos, fígado, baço, medula óssea, glândulas adrenais, tegumento e sistema esquelético. Os sinais clínicos são observados de acordo com os órgãos e sistemas envolvidos (WHEAT et al., 2007; FERREIRA; BORGES, 2009). Cerca de 90% dos casos de disseminação são fatais quando não recebem tratamento adequado (SEGURO; SILVEIRA, 2008; FERREIRA; BORGES, 2009). Pacientes imunocomprometidos especialmente HIV positivos são os mais afetados, muito embora um reduzido número de pessoas sadias ou que apresentam alguma forma de imunodepressão chegam a desenvolver a histoplasmose disseminada (BRILHANTE et al., 2012b)

Como abordado anteriormente, vale salientar, que com frequência, a coccidioidomicose pulmonar progressiva e histoplasmose pulmonar crônica assemelham-se a tuberculose quanto à sintomatologia, bem como, quanto aos seus aspectos radiológicos. Desta forma, o uso de exames específicos que determinem o diagnóstico correto destas micoses é essencial para direcionar a terapia antifúngica adequada, principalmente em locais onde estas micoses e a tuberculose, são prevalentes (AIDÉ, 2009; CORDEIRO et al., 2010).

1.2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da coccidioidomicose e da histoplasmose é determinado através da junção de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, sendo este último indispensável para um diagnóstico definitivo. Atualmente, as testes laboratoriais utilizados têm por base as técnicas micológicas, histopatológicas, imunológicas, bem como, moleculares (BLAIR et al., 2006 ROSSINI; GOULART, 2006). Vale ressaltar, que os laboratoristas, por sua vez, sempre devem levar em consideração os dados epidemiológicos no direcionamento do correto diagnóstico de tais infecções.

1.2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

1.2.5.1 Técnicas Micológicas

O diagnóstico micológico da coccidioidomicose e da histoplasmose é iniciado através do exame direto, o qual é realizado através da observação ao microscópio óptico diretamente de espécimes clínicos, a fim de detectar estruturas parasitárias características dos fungos *Coccidioides* spp. e *H. capsulatum*, respectivamente. O

exame direto, quando positivo, pode fornecer um diagnóstico rápido e apresenta um risco muito menor para os laboratoristas comparado ao isolamento em cultura (ROSSINI; GOULART, 2006; SUTTON, 2007). Vale lembrar, que por se tratar espécies fúngicas que apresentam elevada virulência, todos os processamentos dos espécimes suspeitos devem ser executados exclusivamente dentro de cabines de segurança biológica (SUTTON, 2007).

Para a realização do exame direto podem ser utilizados diversos tipos de espécimes clínicos. Na coccidioidomicose, as amostras mais comuns são de escarro fresco, lavado brônquico, aspirado de medula óssea, biópsias de lesões ósseas e de articulações, urina, linfonodos, e outros espécimes semelhantes (GALGANI et al., 2000; LACAZ et al., 2002). A amostra é considerada positiva quando esférulas intactas ou parcialmente intactas são observadas (Figura 5A). Na histoplasmose, as amostras mais frequentes são de creme leucocitário e aspirado de medula óssea, as quais podem ser coradas pela solução de Giemsa. Quando positivas evidenciam a presença de estruturas ovóides pequenas, medindo cerca de 3 a 5 μm , circundadas por um halo claro no interior de macrófagos e monócitos (Figura 5B) (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPE-OLIVEIRA, 2006; ROSSINI; GOULART, 2006).

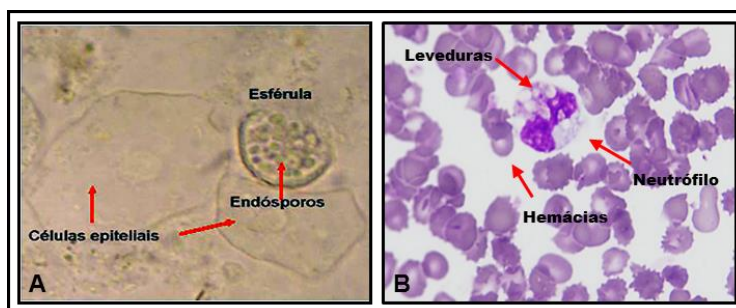


Figura 5. A. Exame direto de escarro em preparação com KOH 30%, mostrando uma esférula de *C. posadasii* repleta de endósporos. Fonte: Cordeiro, 2006; B. Esfregaço de creme leucocitário corado com Giemsa, mostrando leveduras intracelulares de *H. capsulatum*. Fonte: CEMM, 2013.

Concomitante ao exame direto realiza-se também a semeadura dos espécimes clínicos. O isolamento em cultura dos agentes *Coccidioides* spp. e *H. capsulatum*, continua a ser padrão-ouro para um diagnóstico definitivo tanto da coccidioidomicose, quanto da histoplasmose. As espécies *Coccidioides* spp. e *H. capsulatum* não são particularmente exigentes, assim, uma variedade de meios de isolamento primário podem ser utilizados para obtenção destas culturas. Os meios micológicos comumente empregados incluem ágar BHI (*Brain Heart Infusion*), ágar batata dextrose e ágar

sabouraud dextrose com ou sem cicloeximida (GUMARÃES et al., 2006; SABOULLE, 2007). Em espécimes clínicos oriundos de sítios não-estéreis é necessário a prevenção do crescimento excessivo de bactérias e de fungos sapróbios de crescimento mais rápido. Os antibióticos comumente adicionados aos meios de cultura para suprimir o crescimento bacteriano incluem cloranfenicol, gentamicina, estreptomicina e penicilina. A adição de cicloeximida inibe alguns fungos sapróbios, sendo útil como um meio seletivo, uma vez que suporta bem o crescimento de todos os fungos dimórficos (ESPINEL-INGROFF; PFALLER, 2007).

As culturas de *Coccidioides* spp. são geralmente incubadas a 30 °C, no entanto, a temperatura ambiente também é adequada. As colônias se desenvolvem rapidamente, geralmente são observadas dentro de 3-5 dias. Raramente é necessário manter as culturas durante mais de três semanas, salvo em caso de pacientes que se encontravam em tratamento no momento da coleta da amostra (SUTTON, 2007). As colônias são inicialmente brancas a creme brilhante, com textura glabrosa crescendo aderidas ao meio. À medida que amadurecem discretos anéis concêntricos de áreas filamentosas de aspecto algodonofo, contendo arthroconídios, tornam-se visíveis (Figura 6A). Embora as espécies de *Coccidioides* geralmente apresentem colônias de cor branca a esbranquiçada, outras cores têm sido observadas, variando do castanho ao amarelo, rosa ao lilás, marrom pálido ao cinza-escuro. Para a observação da micromorfologia, habitualmente utiliza-se o corante lactofenol azul algodão, com lamínulas devidamente seladas (ESPINEL-INGROFF; PFALLER, 2007). Os arthroconídios de *Coccidioides* spp. devem ser diferenciados de alguns gêneros com arthroconídios similares como *Malbranchea* sp., *Chrysosporium* sp., *Geomyces* sp. e *Sporotrichum pruinosum* (SUTTON, 2007).

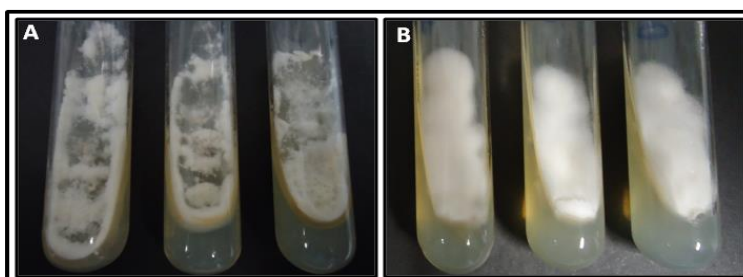


Figura 6. Aspecto macromorfológico da fase filamentososa de *C. posadasii* (A) e *H. capsulatum* (B), após 15 dias de incubação a 28 °C, em ágar Batata, evidenciando colônias de cor branca de textura algodonofo.

Em *H. capsulatum*, as colônias se desenvolvem bem quando incubadas a temperatura ambiente, em torno de 22-28 °C. As colônias são observadas após 1 a 3 semanas de incubação. A macromorfologia apresentada é inicialmente velutosa, mas com o tempo torna-se filamentosa, algodonosa, de coloração branca com micélio aéreo que tende a escurecer com o tempo (Figura 6B) (GUIMARÃES et al., 2006). A micromorfologia apresenta hifas delicadas, septadas e ramificadas, com pequenos microconídios (2 a 4 µm) de paredes lisas e uma grande quantidade de macroconídios tuberculados, medindo de 8 a 15 µm (ROSSINI; GOULART, 2006; KAUFFMAN, 2007). Essas estruturas podem ser confundidas com as estruturas de fungos saprófitas dos gêneros *Chrysosporium* e *Sepedonium*, (WANKE; LAZÉRA, 2004).

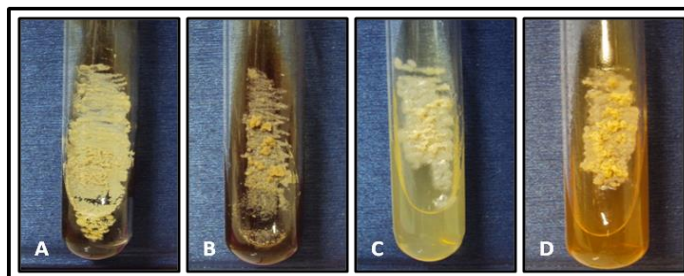


Figura 7. Aspecto macroscópico de *H. capsulatum* na fase de levedura, após 15 dias de incubação a 35 °C em diferentes meios de cultura, evidenciando colônias de textura cremosa, de cor bege, com superfície lisa ou rugosa. A e B. Sabouraud e BHI suplementado com 10% de sangue de carneiro, respectivamente; C e D. Sabouraud e BHI com 1% de glicose, respectivamente. Fonte: Ribeiro, 2012.

O diagnóstico preciso da histoplasmose pode ser obtido através demonstração do processo de conversão da fase filamentosa para a fase leveduriforme. Neste caso, como já abordado anteriormente, utilizam-se meios nutricionais enriquecidos, tais como, ágar BHI ou ágar Sabouraud suplementados com sangue de carneiro, com incubação a 35-37 °C (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006; ROSSINI; GOULART, 2006). Macroscopicamente, as colônias de leveduras de *H. capsulatum*, apresentam coloração branca a marrom, textura cremosa e superfície lisa ou rugosa (Figura 7). Microscopicamente, observam-se células leveduriformes pequenas (1 a 4 µm), redondas ou ovais. A transição de dimórfica é um processo laborioso, que leva pelo menos 2-4 semanas para que a conversão ocorra, prolongando assim o período para obtenção do diagnóstico (RIBEIRO, 2012).

1.2.5.2 Técnicas Histopatológicas

O diagnóstico da coccidioidomicose e da histoplasmose também pode ser obtido através da identificação fúngica em exames histopatológicos, sendo este estabelecido pela identificação dos fungos *Coccidioides* spp. e *H. capsulatum* em sua fase leveduriforme (Figura 8 A e B). Para a visualização adequada das preparações histológicas faz-se uso de colorações próprias para fungos, tais como Gomori-Grocott e ácido periódico de Schiff (PAS). Outras colorações, como hematoxilina-eosina (HE) e Giemsa, também têm sido utilizadas (SAUBOLLE; MCKELLAR; SUSSLAND, 2007; AIDÉ, 2009).

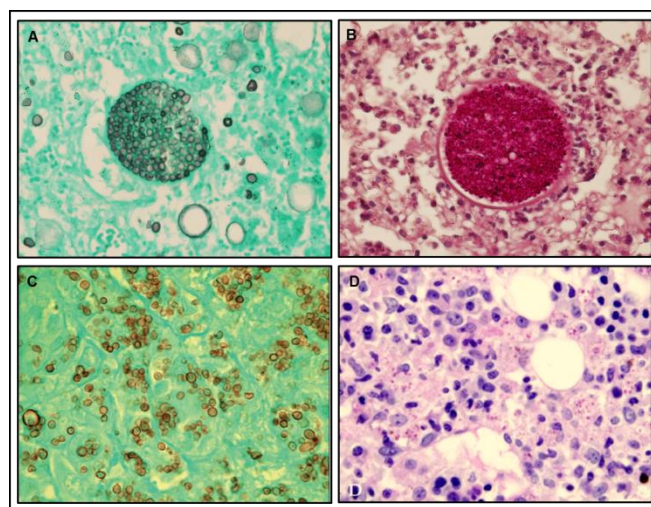


Figura 8. Aspecto histopatológico de *Coccidioides* spp em biópsias de camundongo, evidenciando esférulas maduras contendo um grande número de endósporos, coradas por Grocott-Gomori (A) e PAS (B) (Fonte: CEMM, 2011); Aspecto histopatológico de *H. capsulatum* em biópsias humanas, mostrando células leveduriformes coradas por Grocott-Gomori (C) (Fonte: Cruz, 2013) e PAS (D) (Fonte: Jeong, 2007).

Na coccidioidomicose, a histopatologia é realizada a partir de tecidos ou líquidos de biópsias de lesão tegumentar, pulmonar, osteoarticular, cerebral ou de outros materiais suspeitos e em necropsia. Em amostras positivas são visualizadas esférulas em diferentes estágios de maturação, com endósporos em seu interior (SAUBOLLE; MCKELLAR; SUSSLAND, 2007). O tecido inflamatório é constituído de granulomas, com a presença de células gigantes tipo Langhans, plasmócitos e linfócitos (COX; MAGEE, 2004). Na histoplasmose, as amostras mais comuns incluem biópsia de pulmão, medula óssea, fígado e linfonodos. O exame histopatológico positivo se dá através da visualização de macrófagos parasitados com células leveduriformes, esféricas ou ovaladas, rodeadas por uma parede celular muito fina e hialina (ZANCOPÉ-

OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE, 2005; GUIMARÃES et al., 2006; AIDÉ, 2009). O tecido inflamatório revela a presença de granulomas com ou sem necrose de caseificação, em indivíduos imunocompetentes, enquanto em indivíduos imunocomprometidos, é frequente a presença de granuloma frouxo, agregados linfocitocitários ou apenas infiltrado mono-nuclear difuso (AIDÉ, 2009).

1.2.5.3 Técnicas Imunológicas

Os testes sorológicos são ferramentas auxiliares ao diagnóstico da coccidioidomicose e da histoplasmose, além de revelarem informações importantes sobre a epidemiologia destas doenças (WHEAT, 2007; AMPEL et al., 2009; CORDEIRO et al., 2009a). As técnicas imunológicas adotadas apresentam diferentes níveis de sensibilidade e especificidade (SAUBOLLE; MCKELLAR; SUSSLAND, 2007).

As técnicas atualmente disponíveis para medir a resposta sorológica na coccidioidomicose incluem ensaios imunoenzimáticos (EIAs), imunodifusão (IMDF) e fixação do complemento (CF). A resposta sorológica inclui a produção de anticorpos IgM e IgG. Os anticorpos IgM tornam-se mensuráveis logo no início da fase aguda, entre a 1 e 3^a semana de infecção. A classe de anticorpos IgG reage no final do processo infeccioso, tornando-se mensurável entre 2 e 28^a. Esta classe pode permanecer por vários meses e está relacionada ao prognóstico da infecção (SABOULLE, 2007).

A técnica de fixação do complemento detecta anticorpos tardios do tipo IgG nas formas progressivas e disseminadas da coccidioidomicose, onde os títulos de anticorpos geralmente correlacionam-se diretamente com a gravidade do caso. A imunodifusão pode ser aplicada na detecção de anticorpos IgM e IgG, mas eles exigem longos períodos de incubação (4 dias) para diminuir a ocorrência de falsos negativos (SABOULLE, 2007). Os ensaios imunoenzimáticos também estão disponíveis para a detecção de IgM e IgG, e são aparentemente mais sensíveis do que os outros métodos, todavia, podem apresentar menor especificidade, especialmente se apenas o teste de IgM específica for reativa. Uma análise retrospectiva de EIA, IMDF e FC com soro de pacientes, com cultura positiva, durante a fase aguda da doença, mostrou que a sensibilidade global dos testes imunológicos é de apenas 82%. Portanto, a sorologia

negativa não descarta a coccidioomicose, especialmente na fase inicial da infecção (SAUBOLLE; MCKELLAR; SUSSLAND, 2007).

Na histoplasmose, o diagnóstico sorológico baseia-se na identificação de anticorpos anti-H e anti-M. A soroconversão ocorre tardiamente, sendo necessárias 2 a 6 semanas para o início da detecção de anticorpos. Esses anticorpos podem ser detectados utilizando a histoplasmina, extrato antigênico obtido da fase leveduriforme ou filamentosa de *H. capsulatum*. Os antígenos M e H são os constituintes padrões utilizados nos testes de imunodifusão dupla e fixação do complemento. A presença das precipitinas M e H é considerada conclusiva para o diagnóstico da histoplasmose (GUIMARÃES et al., 2006; KAUFFMAN, 2007). Quando corretamente executados, os testes sorológicos são de grande ajuda no diagnóstico da histoplasmose, com sensibilidade superior a 90% (AIDÉ, 2009).

Além da imunodifusão, dentre as principais técnicas sorológicas utilizadas para o diagnóstico da histoplasmose podemos destacar a fixação do complemento e o radioimunoensaio. Contudo, esses métodos apresentam algumas limitações como, por exemplo, a ocorrência de reações cruzadas com outros fungos causadores de micoses sistêmicas como a blastomicose, coccidioomicose, paracoccidioomicose e aspergilose (KAUFFMAN, 2007; AIDÉ, 2009). Os testes cutâneos com injeções intradérmicas de histoplasmina são amplamente utilizados em inquéritos epidemiológicos, mas não para o diagnóstico da histoplasmose. O teste é positivo, com uma induração de 5 mm ou mais, após 48-72 h da intradermoreação com 0,1 mL do antígeno de *Histoplasma* (GUIMARÃES et al., 2006).

Métodos de detecção de antígenos também têm sido utilizados, especialmente quando a detecção de anticorpos é improvável. Como em pacientes imunocomprometidos, cujos títulos de anticorpos podem não ser confiáveis, uma vez que, estes são incapazes de montar uma resposta imunológica da mesma forma que os pacientes imunocompetentes. Outra vantagem relevante é possibilitar a identificação de casos no início da infecção, antes que a soroconversão possa ser detectada. Para coccidioomicose, resultados promissores na detecção de antígenos específicos de *Coccidioides* spp. em urina por meio de EIA foi demonstrado por Durkin et al., (2008), resultando em 71% de positividade (DURKIN et al., 2008). Para histoplasmose, a detecção de antígenos de *H. capsulatum* pode ser realizada através da técnica de

radioimunoensaio ou ELISA, sendo bastante utilizada em pacientes com histoplasmose aguda e aqueles com histoplasmose disseminada grave. (FERREIRA, BORGES, 2009).

1.2.5.4 Técnicas Moleculares

Como exposto anteriormente, a identificação de *Coccidioides* spp. e *H. capsulatum* carrega consigo um alto risco de contaminação acidental e deveriam ser limitados a laboratórios especializados de biossegurança nível 3. Por isso, um método rápido para a detecção diretamente do material clínico é de grande relevância no diagnóstico e tratamento adequado dos pacientes, além de diminuir os riscos de exposição acidental dos profissionais de laboratório. Assim, o diagnóstico sem a necessidade do isolamento em cultura tem sido explorado por vários pesquisadores, nesse contexto as técnicas de detecção de ácido nucléico têm ganhado destaque (BIALEK et al., 2002a; BIALEK et al., 2002b; BIALEK et al., 2004; BINNICKER et al., 2007).

Dentre os testes realizados diretamente de amostras clínicas, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é o mais utilizado, muitas vezes associada à hibridização de ácidos nucléicos (HAYDEN et al., 2001; BIALEK, 2004, JOHNSON; SIMMONS; PAPPAGIANIS, 2004, GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006). Diferentes alvos têm sido utilizados nas reações de PCR para identificação de *Coccidioides* spp. e *H. capsulatum*. Dentre os mais utilizados podemos citar a região ITS (*internal transcribed spacer*) DNA ribossomal (DNAr) (JIANG et al., 2000; TINTELNOT et al., 2007; BINNICKER et al. em 2007; EISENBERG et al., 2013). Outras regiões específicas de cada fungo também têm sido exploradas com sucesso, a exemplo da sequência de nucleotídeos do *locus* do *antigen2/proline rich*, antígeno específico de *Coccidioides* spp., utilizada em técnicas como *nested* PCR e PCR em tempo real (BIALEK et al., 2004). Em *H. capsulatum*, a região do gene que codifica a proteína Hc100 de 100 kDa específica e essencial para a sobrevivência do patógeno na célula humana, bem como, a sequência do gene que codifica para o antígeno M, uma glicoproteína que ativa a resposta imune humoral e celular, têm sido utilizadas como alvo, por meio de técnicas como *Nested* e *Seminested* PCR (BIALEK et al., 2002b; ELÍAS et al., 2012).

Atualmente, um método que vem se destacando é o de PCR em tempo real, por oferecer vantagens significativas na diminuição de contaminação cruzada e do tempo de análise. Neste método, os resultados são obtidos em cerca de 3 horas, sendo visualizados e quantificados por meio de um *software* acoplado ao termociclador, sem a abertura dos tubos e sem necessidade de realização de um gel de agarose ou poliacrilamida (SIMON et al., 2010). Binnicker et al. em 2007 utilizou esta técnica na detecção de *Coccidioides* spp. a partir do isolamento em cultura ou diretamente de espécimes clínicos. A análise a partir de espécimes respiratórios demonstrou 100% e 98,4% sensibilidade e especificidade, respectivamente, e as amostras de tecido fresco 92,9% de sensibilidade e especificidade de 98,1%, quando comparado com a cultura (BINNICKER et al., 2007). Mais recentemente, Koepsell et al. (2012) demonstraram a aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real para identificação de *H. capsulatum* direta amostras de tecido humano fixado em formalina. Esse estudo conseguiu detectar até 6 pg/ μ L de DNA de *H. capsulatum* nessas amostras, demonstrando a alta sensibilidade da técnica (KOEPSSELL et al., 2012).

Vale salientar, que a identificação molecular de *Coccidioides* spp. e de *H. capsulatum* ainda funciona apenas como ferramenta complementar ao diagnóstico laboratorial da coccidioidomicose e da histoplasmosse, respectivamente. Uma vez que, estas técnicas ainda são consideradas ferramentas complexas que possuem aplicação limitada pelo seu custo elevado. Ademais, na prática laboratorial será preciso interpretar se um resultado de PCR positivo indica a presença viável do microrganismo relacionado à doença ou a sua detecção é indício de uma antiga infecção. (BINNICKER et al., 2007; TINTELNOT et al., 2007).

1.3 AGENTES ANTIFÚNGICOS E SUA CORRELAÇÃO COM *H. CAPSULATUM* E *COCCIDIOIDES* SPP.

Para iniciar o tratamento da coccidioidomicose e da histoplasmosse faz-se necessário o reconhecimento da extensão da infecção e da identificação de fatores que predis põem o hospedeiro à gravidade dessas doenças. Visto que, em ambos os casos, pacientes com infecções pulmonares localizadas e sem fatores de risco para complicações, muitas vezes necessitam apenas reavaliação periódica para demonstrar a resolução espontânea de seu processo infeccioso, sendo repouso e observação clínica as medidas mais eficazes. Por outro lado, os pacientes com ampla disseminação da

infecção ou que estão em alto risco de complicações devido à imunossupressão ou a outros fatores preexistentes, requerem obrigatoriamente estratégias adequadas de tratamento (GALGIANI et al., 2005; WHEAT et al., 2007).

Os tratamentos existentes para os quadros agudos, crônicos ou disseminados de coccidioidomicose e de histoplasmose, podem ser prolongados e difíceis de tolerar, uma vez que a terapia geralmente varia de meses até anos de duração. Em alguns pacientes, a terapia é necessária ao longo de sua vida supressiva, para prevenção de recaídas (GALGIANI et al., 2005; WHEAT et al., 2007). Dentre as opções terapêuticas atualmente disponíveis, os derivados azólicos, tais como itraconazol, fluconazol, e mais recentemente o voriconazol, têm substituído a anfotericina B no tratamento da maioria das infecções, sendo utilizados especialmente em pacientes com manifestações leves ou moderadas. Os antifúngicos da classe dos azólicos também são comumente utilizados como terapia de manutenção após o tratamento inicial com anfotericina B, em pacientes com formas mais severas da doença (GALGIANI et al., 2005; AIDÉ, 2009). Assim, apesar do uso da anfotericina B continuar sendo considerado “padrão ouro” no tratamento dessas micoses sistêmicas, devido a sua elevada toxicidade, esta droga tem sido reservada apenas para casos mais graves (JOHNSON; EINSTEIN, 2007; WHEAT et al., 2007), como em pacientes com infecções de progressão rápida, imunossupressão grave, insuficiência respiratória ou mulheres durante a gestação (GALGIANI et al., 2005).

1.3.1 DROGAS ANTIFÚNGICAS CLÁSSICAS E TESTE DE SENSIBILIDADE *IN VITRO*

Atualmente o arsenal antifúngico disponível para o tratamento das infecções fúngicas oportunistas e sistêmicas, ainda é restrito a poucas classes de drogas (RAPP, 2004; GONZÁLEZ, 2009). A seleção dos antifúngicos utilizados leva em consideração especialmente a sensibilidade do agente causal, toxicidade do medicamento, o tipo de administração do fármaco (uso endovenoso ou oral), as possíveis interações medicamentosas e o custo do tratamento (GALGIANI et al., 2005; WHEAT et al., 2007). A anfotericina B (AMB), os derivados azólicos e as equinocandinas estão entre os principais fármacos utilizados, os quais se diferenciam quanto aos seus mecanismos de ação (Figura 9) (PAGANO et al., 2007; PETRIKKOS; SKIADA, 2007).

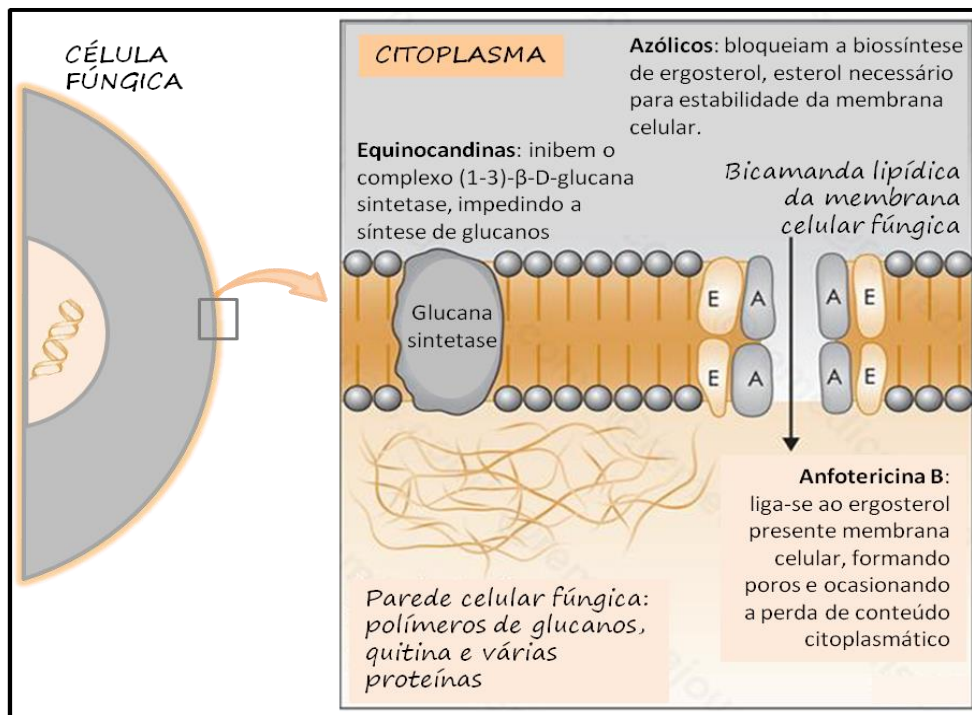


Figura 9: Desenho esquemático evidenciando o mecanismo de ação dos antifúngicos: anfotericina B, azólicos e equinocandinas. Fonte: adaptado de El Chakhtoura, 2010.

A anfotericina B é produzida pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus* e agrupa-se aos antibióticos poliênicos. Trata-se um macrocíclico que possui um comportamento anfotérico devido à presença de um grupo carboxila no seu anel principal e de um grupo amino primário na micosamina (3-amino-3,6-didesoximanose) (FILIPPIN; SOUZA, 2006). Atua como fungicida ligando-se ao ergosterol, esteróide presente na membrana celular fúngica, levando a alterações na estrutura da membrana, provavelmente pela formação de poros, alterando a permeabilidade desta e causando a perda de constituintes citoplasmáticos para o meio extracelular, ocasionando assim a morte do microrganismo. Adicionalmente, leva a uma lesão oxidativa que resulta em alterações metabólicas prejudiciais à sobrevivência celular (GALLIS; DREW; PICKARD, 1990). Os danos aos microrganismos dependem de fatores, como a fase de crescimento da célula, a dose e a via de administração da droga (CATALÁN; MONTEJO, 2006).

Os efeitos adversos observados a partir do uso da anfotericina B incluem: efeitos imediatos, como febre, calafrios, taquicardia, hipertensão arterial, náuseas, vômitos; e efeitos tardios, com destaque para sua elevada nefrotoxicidade (MARTINEZ, 2006). Seu efeito tóxico deve-se principalmente à semelhança entre as estruturas moleculares do ergosterol das células fúngicas e do colesterol presente nas células dos mamíferos. Assim, essa similaridade faz com que anfotericina B também possa ligar-se ao

colesterol, embora com menor afinidade (HUANG et al., 2002). Por isso, diferentes formulações da Anfotericina B já foram desenvolvidas com o intuito de melhorar sua tolerabilidade, porém sem diminuir sua eficácia (CATALÁN; MONTEJO, 2006). À exemplo, temos a AMB complexo lipídico, AMB dispersão coloidal e AMB lipossomal. Essas formulações apresentam menor nefrotoxicidade que a droga convencional, mas ainda são mais nefrotóxicas que os triazóis e as equinocandinas (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008).

Apesar da sua elevada toxicidade, a anfotericina B ainda é considerada a droga de referência no controle de infecções fúngicas sistêmicas devido a sua eficácia e seu largo espectro antifúngico (MARTINEZ, 2006). A anfotericina B é utilizada na terapia contra infecções sistêmicas causadas pelos principais fungos dimórficos, tais como, *Coccidioides* spp., *H. capsulatum*, *Sporothrix* spp., *Paracoccidioides* spp. e *Blastomyces dermatitidis*, bem como, contra infecções oportunistas causadas por leveduras do gênero *Cryptococcus* e *Candida* (MARTINEZ, 2006). As espécies de *Aspergillus* spp. *Mucor* spp. e *Rhizopus* spp. também mostram-se sensíveis a este fármaco. Vale ressaltar que algumas espécies de *Candida* spp., *Trichosporon* spp. e *Fusarium* spp. podem apresentar resistência clínica (LUMBRERAS; LIZASOAIN; AGUADO, 2003). Esta resistência pode ser associada a uma alteração na composição da membrana fúngica, na qual a síntese de ergosterol é diminuída e o mesmo é substituído por outros esteróis de menor afinidade com a droga (THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009).

Os azólicos são compostos sintéticos, fungistáticos, caracterizados por um anel pentagonal na estrutura molecular. Os imidazólicos são formados por três átomos de carbono e dois átomos de nitrogênio e são representados pelo miconazol e o cetoconazol. As manipulações do núcleo imidazólico geraram os triazólicos que apresentam dois átomos de carbono e três átomos de nitrogênio, representados pelo itraconazol e o fluconazol (CATALÁN; MONTEJO, 2006). E, mais recentemente surgiram os triazólicos de segunda geração como voriconazol e dois novos representantes que ainda se encontram em fase de pesquisa, o posaconazol e o ravuconazol (MARTINEZ, 2006).

O mecanismo de ação dos derivados azólicos ocorre através da inibição da biossíntese do ergosterol, pelo bloqueio da enzima 14- α -demetilase, presente no

citocromo P-450 da célula fúngica, essencial para a conversão de lanosterol em ergosterol (CATALÁN; MONTEJO, 2006; CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008). A deficiência de ergosterol provoca acúmulo de compostos metilesteróis, levando ao desenvolvimento de uma membrana com propriedades alteradas, não satisfazendo as funções fundamentais para o desenvolvimento fúngico (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

A especificidade dos azóis decorre da grande afinidade destes fármacos pelas enzimas do citocromo P-450 dos fungos. Contudo, por também interferirem nas enzimas hepáticas e intestinais do citocromo P-450 de humanos, estes fármacos podem apresentar efeitos adversos e interagir com outros medicamentos. (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008). De modo geral, os efeitos colaterais dos azólicos, como hepatotoxicidade, intolerância gastrointestinal, hipersensibilidade, náuseas, vômitos e diarreia, são considerados benignos (MARTINEZ, 2006). Os triazóis por apresentarem maior grau de especificidade, vêm substituindo os imidazóis, levando assim a menor incidência de interações medicamentosas e a menos efeitos colaterais (MARTINEZ, 2006).

Desta forma, os triazólicos são atualmente os antifúngicos mais utilizados, exibindo atividade antifúngica contra muitos patógenos, sem apresentar os graves efeitos nefrotóxicos observados com a administração da AMB. O espectro de ação dos triazólicos é bastante amplo e abrangem os agentes das principais infecções fúngicas sistêmicas atuais: *Coccidioides* spp., *H. capsulatum*, *Paracoccidioides* spp., *B. dermatitidis*, além do gênero *Cryptococcus* e da maioria das espécies de *Candida*, sendo as espécies *C. krusei* e *C. glabrata*, menos sensíveis (MARTINEZ, 2006).

As equinocandinas compõem um grupo semi-sintético de agentes antifúngicos, derivados da pneumocandina B, isolada pela primeira vez em 1974, de culturas de *Aspergillus* spp. (GOBERNADO; CANTÓN, 2008). São compostos cíclicos macrolipopeptídicos caracterizados por um anel de seis aminoácidos ligados a uma cadeia lateral lipofílica. Esta cadeia está sujeita a vários padrões de hidroxilação, apresentando-se em diferentes formas. A caspofungina é um derivado da pneumocandina B originada pelo fungo *Glarea lozoyensis* e é caracterizada por um ácido graxo na cadeia lateral. A micafungina é derivada de *Coleophoma empetri* e

apresenta um complexo aromático. Enquanto a anidulafungina deriva de *Aspergillus nidulans* e tem uma cadeia alcoxitrifênilo (GOBERNADO; CANTÓN, 2008).

Estes fármacos são inibidores não competitivos e irreversíveis da enzima (1,3)- β -D-glucano sintase, inibindo assim a síntese do (1,3)- β -D-glucano, componente essencial da parede celular fúngica (CHANDRASEKAR; SOBEL, 2006). Na ausência deste componente ocorrem danos estruturais na parede, alterando a integridade, rigidez, crescimento e divisão celular, ocasionando assim a morte do microrganismo (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008). Devido à ausência de parede celular e de seus componentes (quitina, α -glucanos e/ou β -glucanos) nas células dos mamíferos, as equinocandinas apresentam baixa toxicidade (CHANDRASEKAR; SOBEL, 2006). Não há relatos de efeitos adversos graves, apenas sintomas, como flebites, náuseas, vômitos, diarreia e cefaléia (AZANZA; MONTEJO, 2008).

Atualmente, as equinocandinas são consideradas um importante grupo de drogas no tratamento da candidíase superficial e invasiva e de aspergiloses (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008). São ativas contra várias espécies de *Candida*, incluindo *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008). É menos ativa contra fungos zigomicetos e dos gêneros *Cryptococcus* spp., *Rhizopus* spp. *Fusarium* spp. Também mostra pouca eficácia frente a espécie *Trichosporon asahii* (CATALÁN; MONTEJO, 2006; PERLIN, 2011).

Apesar das equinocandinas apresentarem atividade limitada frente *Coccidioides* spp. na sua fase micelial *in vitro*. A caspofungina tem apresentando potencial eficácia em modelos animais da infecção, ademais, relatos de eficácia terapêutica especialmente no tratamento de casos refratários de coccidiodomicose têm sido descritos (PARK et al., 2006; LEVY et al., 2013). Vale ressaltar que, o uso deste agente em monoterapia não é recomendado, bem como, para casos de meningite coccidióica (PARK et al., 2006). Para *H. capsulatum* os resultados obtidos para caspofungina mostram grande variabilidade na resposta *in vitro* (BRILHANTE et al., 2012b). A baixa eficácia da caspofungina no tratamento em modelos animais de histoplasose tem sido relatada em vários estudos (KHOLER et al., 2000; FINQUELIEVICH et al., 2011). Além disso, na prática clínica falha terapêutica também foi observada (VAN KOEVERINGE; BROUWER, 2010). Desta forma, o uso de equinocandinas frente *H. capsulatum* não é recomendado (WHEAT et al., 2007; KAUFFMAN, 2009).

Nos últimos anos, a necessidade de melhorar o arsenal de drogas antifúngicas tornou-se imprescindível, devido ao aumento na incidência de infecções fúngicas graves, o qual está associado à melhoria dos métodos de diagnóstico micológico, ao uso indiscriminado de drogas citotóxicas e imunossupressoras, bem como, ao aumento no número de pacientes imunocomprometidos. Como exposto anteriormente, ainda há um número reduzido de drogas utilizáveis na prática clínica para o controle das diversas infecções causadas por fungos (MARTINEZ, 2006). Assim, em conjunto com a ampliação do interesse no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos surgiu a necessidade da utilização de normas e métodos laboratoriais padronizados para testes de sensibilidade antifúngica (COLOMBO, ALVES 2004).

De modo geral, os testes de sensibilidade, *in vitro*, são utilizados para analisar a atividade de um agente terapêutico frente a um determinado micorganismo, permitindo o direcionamento no tratamento contra o referido patógeno. Diferentemente dos testes de sensibilidade antibacteriana, os testes de sensibilidade antifúngica não prevêem a resposta terapêutica com considerável precisão (REX; PFALLER, 2002). Apesar do relato de Rex; Pfaller (2002) determinar uma relativa precisão para azólicos frente espécies de *Candida*, resumida na "regra 90-60", que prediz que 90% dos isolados sensíveis *in vitro*, são também responsivos ao tratamento, enquanto, 60% isolados resistentes *in vitro*, são de fato não responsivos a terapia. Tal regra, ainda mostra improvável utilidade para influenciar diretamente a seleção terapêutica e não pode ser extrapolada para outras associações micorganismo-droga (REX; PFALLER, 2002).

Contudo, vale ressaltar que os testes de sensibilidade antifúngica são capazes de fornecer uma estimativa confiável da atividade relativa de dois ou mais agentes antifúngicos, além de possibilitar o monitoramento do desenvolvimento de resistência entre uma espécie fúngica normalmente sensível e predizer o potencial terapêutico de novos agentes recém desenvolvidos e em avaliação (MURRAY, 2010b). Ademais, a padronização dos testes de sensibilidade antifúngica é de grande relevância, uma vez que, garante a reprodutibilidade dos resultados e permite a análise interlaboratorial dos estudos publicados (CLSI, 2008a).

Atualmente, os métodos propostos para avaliar a atividade antifúngica seguem normas padronizadas por órgãos internacionais como *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility*

Testing (EUCAST). Esses órgãos disponibilizam normas de referência para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos patogênicos. Tais normas tratam da metodologia para seleção e preparação dos agentes antifúngicos; da interpretação e implementação dos testes; bem como, da realização de testes de controle de qualidade. Tendo como objetivo, promover a concordância entre os laboratórios na determinação da sensibilidade fúngica aos agentes antifúngicos, de forma que os métodos padronizados sejam reproduzíveis, sensíveis e viáveis para uso em laboratórios clínicos de rotina (ESPINEL-INGROFF; PFALLER, 2007).

O primeiro documento padronizado aprovado para avaliação da sensibilidade antifúngica foi publicado em 1997 pelo CLSI, no documento M27-A – Método de referência para teste de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras a terapia antifúngica (HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004). Desde então, o documento já passou por duas atualizações, sendo sua última versão, o M27-A3, publicada em 2008. Este documento propõe avaliar a sensibilidade *in vitro* de leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus neoformans* (CLSI, 2008a).

Em 2002, foi publicado o documento M38-A – Método de referência para teste de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de fungos filamentosos. Em 2008, foi publicada a segunda edição deste documento (M38-A2), destinada a fungos filamentosos causadores de infecções fúngicas oportunistas e invasivas. Atualmente, engloba as espécies *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus arrhizus* (*R. arrhizus*), *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*) e *Sporothrix schenckii*, bem como, causadores de micoses cutâneas incluindo, os dermatófitos (*Trichophyton* sp., *Microsporum* sp. e *Epidermophyton* sp.) (CLSI, 2008b).

Ambos os documentos referem os principais critérios a serem adotados para a realização dos testes de sensibilidade, tais como: meio de cultura padrão RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) – 1640, tamponado com ácido o 2-[N-morfolino]-propanossulfônico (MOPS) 0,165M a pH 7,0, a carga fúngica e o preparo do inóculo, tempo e temperatura de incubação, leitura visual e determinação de *breakpoints*. Ademais, também incluem as condições de ensaio para as drogas antifúngicas anfotericina B, os azólicos (itraconazol, cetoconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol), terbinafina, griseofulvina, ciclopirox e as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) (CLSI, 2008a; CLSI, 2008b).

Embora os testes de sensibilidade antifúngica, *in vitro*, para os gêneros *Coccidioides* e *Histoplasma*, permaneçam não padronizados pelos laboratórios especializados, os documentos M38 e M27 preconizado pelo CLSI têm sido bastante utilizados por diferentes pesquisadores para determinar a sensibilidade desses patógenos frente a diferentes drogas (NAKAI et al., 2003; CORDEIRO et al., 2009b; BRILHANTE et al., 2010). Para tanto, o teste aplicado inclui adaptações, especialmente no preparo do inóculo e tempo de incubação (CORDEIRO et al., 2009b; BRILHANTE et al., 2010).

A sensibilidade pode ser avaliada através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ou Concentração Fungicida Mínima (CFM), consideradas como a menor concentração da droga capaz de inibir ou cessar o crescimento fúngico, respectivamente. Por não existir *breakpoints* definidos, os valores de CIM's acima dos níveis de segurança, relativos à toxicidade, ou além dos níveis atingíveis no paciente sugeriria resistência em potencial (SUTTON, 2007). De acordo com a literatura, os gêneros *Coccidioides* e *Histoplasma* são habitualmente sensíveis, *in vitro*, a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol e capofungina (CORDEIRO et al., 2006c; BRILHANTE et al., 2012b). Falhas terapêuticas com o uso de fluconazol têm sido relatadas e, em alguns casos, parcialmente atribuídas a microrganismos resistentes, entretanto, deve-se ressaltar que de modo geral há falta de correlação entre atividade *in vitro* e a eficácia clínica (SUTTON et al., 2007; WHEAT et al., 2009).

Apesar dos agentes antifúngicos disponíveis geralmente proporcionarem terapias antifúngicas eficazes contra os casos de coccidioidomicose e histoplasmose, infecções refratárias e recaídas, especialmente em pacientes com doença disseminada, já foram relatadas (WHEAT et al., 2006; STEVENS et al., 2007; WHEAT et al., 2009; SCHEIN et al., 2011). Ademais, a anfotericina B, considerada droga de escolha para o tratamento dos casos mais graves é potencialmente nefrotóxica (ROYCE; HANS, 2007), apenas 50-60% dos pacientes com coccidioidomicose mostram-se responsivos ao tratamento com os azólicos fluconazol e itraconazol (GALGANI et al., 2005) e apenas 56-70% dos pacientes com histoplasmose são responsivos a cetoconazol (WHEAT et al., 2009).

Este cenário tem incentivado a investigação de novos agentes antifúngicos contra fungos dimórficos *Coccidioides* spp. e *H. capsulatum*, além disso, a recente

disponibilidade de novos agentes antifúngicos também tem impulsionado o interesse por estudos em busca por combinações terapêuticas sinérgicas (JOHNSON et al. 2004).

1.3.2 GENERALIDADES SOBRE O SESQUITERPENO FARNESOL

O composto orgânico farnesol é um álcool acíclico sesquiterpeno encontrado sob a forma de um líquido incolor, insolúvel em água, mas miscível em óleos. Este composto é um isoprenóide, não-esterol produzido pela desfosforilação do Farnesil Pirofosfato (FPP), elemento básico da maioria dos sesquiterpenóides acíclicos, atuando como precursor de um grande número de compostos naturais e artificiais (JOO, JETTEN, 2010). A substância química recebeu o nome farnesol por ser encontrada no extrato de flores da árvore acácia Farnese (*Vachellia farnesiana*), planta bastante utilizada em perfumaria e fonte comercial da essência floral em que foi identificado o composto (QAMAR et al., 2012).

O farnesol é naturalmente encontrado em óleos essenciais de diversas plantas, tais como, capim-limão (*Cymbopogon citratus*) (REICHLING et al., 2009), bengo (*Pluchea dioscoridis*) (GRACE, 2002), árvore-do-incenso (*Pittosporum undulatum*) (MEDEIROS et al., 2003), milho (*Zea mays*) (SCHNEE et al., 2002) citronela (*Cymbopogon nardus*), rosa (*Rosa damascena*) (ALMASIRAD et al., 2007), balsamo de tolu (*Toluifera balsamum*) (CUSTÓDIO, VEIGA-JUNIOR, 2012), ciclâmen (*Cyclamen persicum*) (JALALI et al., 2012), camomila (*Matricaria recutita*) (PETRONILHO et al., 2011), dentre outros (JOO, JETTEN, 2010). Também é um dos compostos encontrados na própolis, sendo apontado como uma das substâncias biologicamente ativas que apresentam atividade antimicrobiana, atuando assim como mecanismo de defesa ao ataque de patógenos (JEON et al., 2011).

Ademais, o farnesol e seus derivados atuam como precursores na via de biossíntese de esteróis isoprenóides, que por sua vez, são essenciais na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular, bem como, na biossíntese de lipídios em plantas, animais e fungos (HORNBY et al., 2001; CHO et al., 2008; JOO, JETTEN, 2010). A via do mevalonato leva à síntese de farnesil-PP, que por sua vez é ponto de ramificação de diversas vias, estando envolvido na prenilação de muitas proteínas, e, subsequentemente, biossíntese do colesterol, esteróis como o ergosterol e outros derivados (Figura 10) (JOO, JETTEN, 2010).

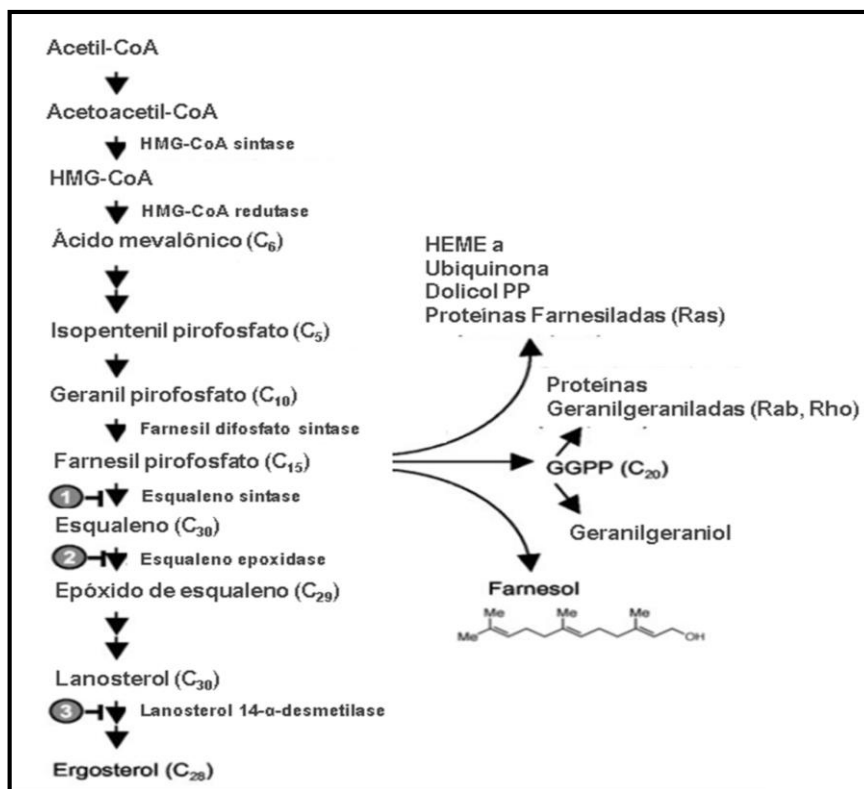


Figura10. Farnesil pirofosfato como um ponto de ramificação na cadeia metabólica de lipídios. Fonte: Teixeira, 2011.

O farnesol ganhou maior relevância em micologia quando Hornby et al., (2001), relataram que o composto atua como uma molécula *quorum sensing* (MQS) em *Candida albicans*. As propriedades do farnesol mostraram-se apropriadas para o seu papel como MQS, tais como sua baixa solubilidade em água, difusão no meio extracelular, produção contínua e proporcional ao crescimento celular, estabilidade ao calor, dentre outras (HORNBY et al., 2001). Os estudos mostraram que esta molécula sinalizadora é sintetizada por essa espécie de levedura para mediar o processo de comunicação controlando fatores como, densidade populacional, morfogênese celular, inibição da conversão da forma levedura para micélio (HORNBY et al., 2001) e formação de biofilme (RAMAGE et al., 2002), contudo, sem alterar a taxa de crescimento celular. Tal observação indica que o seu modo de ação é mais específico do que apenas uma inibição geral do metabolismo celular (HORNBY et al., 2001).

Posteriormente, o farnesol foi relatado como responsável por aumentar significativamente a capacidade da espécie *C. albicans* colonizar novos ambientes, uma vez que, a produção do composto provoca apoptose celular de outras espécies de fungos (euascomycetes), bloqueando o crescimento e desenvolvimentos de competidores que

partilham o mesmo habitat, reduzindo, desta forma, a competição por fontes de nutrientes (SEMIGHINI et al. 2006). Outra consideração relevante é que o farnesol pode ser expresso dentro do ambiente do hospedeiro, atuando como um fator de virulência ao induzir apoptose em células do sistema imunológico, tais como os macrófagos (SEMIGHINI et al. 2006). Mais recentemente, foi demonstrado que este composto também apresenta papel importante na resistência ao estresse oxidativo (DEVEAU et al., 2010). Além de apresentar efeito citotóxico em *C. albicans*, em determinadas concentrações e condições ambientais (SHIRTLIFF et al., 2009; LANGFORD et al., 2010)

Atualmente, o composto farnesol tem ganhado destaque devido a sua elevada atividade antimicrobiana demonstrada ante bactérias e fungos (INOUE et al., 2004; JABRA-RIZK et al., 2006a; JABRA-RIZK et al., 2006b; BRILHANTE et al., 2012c; CORDEIRO et al., 2013). Vários estudos têm confirmado a atividade antibacteriana do farnesol especialmente ante a patógenos humanos, como *Escherichia coli* (BREHM-STECHER et al., 2003) *Staphylococcus aureus* (INOUE et al., 2004), *Streptococcus mutans* (KOO et al., 2005) e *Burkholderia pseudomallei* (BRILHANTE et al., 2012c). Relevante até mesmo na inibição do crescimento bacteriano sob a forma de biofilme (JABRA-RIZK et al., 2006a). Seu potencial antifúngico já foi demonstrado frente a diferentes espécies do gênero *Candida* (CORDEIRO et al., 2013) e *Cryptococcus* (CORDEIRO et al., 2012), bem como, contra o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, no qual além de agir inibindo o crescimento, além de e retardar a formação do tubo germinativo, em concentrações que não afetam a viabilidade deste fungo (DERENGOWSKI et al., 2009). Além disso, também apresenta efeito inibitório sobre biofilme fúngico (RAMAGE et al., 2002; YU et al., 2012)

É importante ressaltar, que os relatos na literatura também evidenciam que o farnesol é capaz de desempenhar uma importante atividade como adjuvante terapêutico promovendo a reversão de resistência às drogas. antimicrobianas tanto em bactérias (BREHM-STECHER et al., 2003; JABRA-RIZK et al., 2006a) quanto em fungos (YU et al., 2012; CORDEIRO et al., 2013). Foi demonstrado também que o farnesol apresenta baixa toxicidade *in vivo*, como relatado por Navarathna et al. (2007), cujo administração do composto mostrou efeito tóxico insignificante em modelos murinos (NAVARATHNA et al., 2007).

Diante do exposto, o farnesol devido suas propriedades, tais como, atividade antimicrobiana, efeito adjuvante na reversão do fenômeno de resistência a drogas, efeito inibitório sob a forma de biofilme, bem como, sua baixa toxicidade em modelos animais, apresenta uma perspectiva interessante como um possível agente antifúngico ante aos fungos dimórficos *Coccidioides* spp. e *H. capsulatum* causadores da coccidioidomicose e da histoplasmose, respectivamente.

1.3.3 ÍNDICE DE COMBINAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONÁRIA E SUA CORRELAÇÃO COM SINERGISMO E ANTAGONISMO DE DROGAS

O uso de drogas em combinações visam os benefícios terapêuticos proporcionados por combinações sinérgicas. Os resultados favoráveis possíveis do sinergismo entre drogas incluem, o aumento na eficácia do efeito terapêutico; a diminuição da dosagem, com manutenção ou incremento da eficácia e a diminuição do fenômeno de resistência. Desta forma, acredita-se que o uso de drogas múltiplas, com mecanismos de ação diferentes, possam atingir alvos múltiplos e agir de forma mais eficaz (CHOU, 2006).

Os estudos dos efeitos interativos para utilização das drogas antimicrobianas, em combinações duplas ou triplas de agentes inibitórios, começa com testes *in vitro* que mostram interações positivas na inibição do crescimento do microrganismo alvo. Há muitos modelos experimentais para medir tais efeitos combinados. Uma das formas mais aceitas na interpretação da ação de drogas combinadas, *in vitro* é a avaliação do FICI (*Fractional Inhibitory Concentration Index*), onde os valores de CIM obtidos com as drogas isoladas e os valores de CIM das drogas combinadas são utilizados como base para o cálculo. Assim, a soma da razão da CIM isolada e da CIM combinada de cada droga dá origem ao FICI, seguindo a equação representada na figura 11. As CIM's podem ser obtidas com base nos testes de diluição em caldo, supracitados ou em ensaios em "tabuleiro de damas", no qual é testada uma matriz bidimensional de concentrações em série dos compostos (ODDS, 2003).

$$\text{FICI} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B$$

Onde:

$$\text{FIC}_A = \text{CIM}_{\text{droga A em combinação}} / \text{CIM}_{\text{droga A isoladamente}}$$

$$\text{FIC}_B = \text{CIM}_{\text{droga B combinação}} / \text{CIM}_{\text{droga B isoladamente}}$$

Figura 11: Determinação do Índice de Combinação Inibitória Fracionária

Para demonstrar que combinações de agentes podem exercer efeitos inibitórios que são maiores do que a soma dos seus efeitos sozinhos (sinergismo), ou menos do que a soma destes efeitos (antagonismo), utiliza-se parâmetros predeterminados, onde, valores de FICI menores ou iguais a 0,5 são indicativos de sinergismo, os maiores que 4,0 sugerem antagonismo e os valores entre 0,5 e 4,0 são considerados indiferentes (ODDS, 2003). Na prática, o resultado sinérgico *in vitro*, ocorre quando duas ou mais drogas em combinação apresentam CIM significativamente menores quando comparadas as CIM's encontradas para estas mesmas drogas isoladas. Antagonismo é detectado quando são descobertos valores de CIM maiores para as drogas em combinação. Por fim, os resultados indiferentes são obtidos quando os valores de CIM em combinação não apresentam diferenças significativas entre valores de CIM encontrados para as drogas isoladas (JOHNSON, 2004).

Alguns estudos já apresentam relatos de combinações utilizando drogas antifúngicas que apresentam efeito sinérgico. Estudos *in vitro* realizados por Medrano (2010) mostrou a ação sinérgica entre anfotericina B e voriconazol ante *C. posadasii*. Combinações com os azólicos cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol com drogas anti-tuberculose frente a cepas de *C. posadasii* (CORDEIRO et al., 2009b) e *H. capsulatum* (CORDEIRO et al., 2011), também mostraram sinergismo. A associação *in vitro* entre equinocandinas e outras drogas antifúngicas demonstram sinergismo para caspofungina com anfotericina B (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004) e para caspofungina combinada com os azólicos itraconazol, voriconazol e posaconazol frente à *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. (ESPINEL-INGROFF, 2003).

2. PERGUNTAS DE PARTIDA

1. Os isolados de *C. posadasii* oriundos do Nordeste brasileiro apresentam perfis moleculares distintos por meio das técnicas de RAPD-PCR e M13-PCR *fingerprinting*?
2. As cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* oriundas do estado Ceará são capazes de formar biofilme?
3. O sesquiterpeno farnesol apresenta efeito inibitório *in vitro* ante aos fungos *C. posadasii* e *H. capsulatum* var. *capsulatum*?
4. O farnesol altera a sensibilidade *in vitro* de cepas de *C. posadasii* e *H. capsulatum* var. *capsulatum* ante a drogas antifúngicas?
5. O farnesol atua sobre a célula fúngicas de *C. posadasii* causando a redução da produção de ergosterol?
6. O farnesol possui efeito inibitório sobre o biofilme fúngico de *H. capsulatum* var. *capsulatum*?

3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

1. Os isolados de *C. posadasii* mostram perfis moleculares diferentes diante das técnicas de RAPD-PCR e M13-PCR *fingerprinting*, permitindo a caracterização de agrupamentos genéticos de acordo com os polimorfismos apresentados.
2. Os isolados de *H. capsulatum* var. *capsulatum* provenientes do estado do Ceará, de origem humana ou veterinária, são capazes de formar biofilme *in vitro*.
3. As espécies fúngicas *C. posadasii* e *H. capsulatum* var. *capsulatum* apresentam inibição de crescimento significativas quando expostas ao composto farnesol, *in vitro*.
4. *In vitro*, o farnesol em combinação com antifúngicos apresenta efeito sinérgico, potencializando assim, o efeito inibitório destas drogas ante *C. posadasii* e *H. capsulatum* var. *capsulatum*.
5. A exposição da célula fúngica ao farnesol leva a inibição da produção de ergosterol causando alterações na permeabilidade da membrana celular.
6. O farnesol é capaz de inibir o crescimento de isolados de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, mesmo quando as células estão associadas em biofilme.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização molecular de isolados de *Coccidioides posadasii* oriundos do Nordeste brasileiro, a fim de se obter marcadores genéticos, além de, avaliar a capacidade de formação de biofilme de isolados de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* do estado do Ceará, bem como, determinar o efeito *in vitro* do sesquiterpeno farnesol ante aos fungos dimórficos *C. posadasii* e *H. capsulatum* var. *capsulatum*, avaliando sua atuação sobre o crescimento fúngico, sensibilidade aos antifúngicos, permeabilidade celular, produção de ergosterol e sobre o crescimento em biofilme.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter o perfil molecular de isolados de *C. posadasii* através da técnica de RAPD-PCR e M13-PCR *fingerprinting*;
2. Determinar a Concentração Inibitória Mínima do farnesol *in vitro* frente a cepas de *C. posadasii*;
3. Definir a sensibilidade *in vitro* do farnesol em combinação com os antifúngicos: anfotericina B, itraconazol, voriconazol e caspofungina ante *C. posadasii*.
4. Aferir a atividade *in vitro* do farnesol, na presença de estresse osmótico induzido por NaCl, contra *C. posadasii*;
5. Avaliar o efeito *in vitro* de farnesol na concentração de ergosterol celular em cepas de *C. posadasii*;
6. Determinar a Concentração Inibitória Mínima do farnesol *in vitro* frente a cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* na fase filamentosa e na fase leveduriforme;
7. Avaliar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* de cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* na fase leveduriforme;
8. Definir a sensibilidade *in vitro* do farnesol em combinação com anfotericina B e itraconazol ante *H. capsulatum* var. *capsulatum*;
9. Delinear a atividade *in vitro* de farnesol isolado e em combinação com anfotericina B e itraconazol frente a isolados de *H. capsulatum* var. *capsulatum* na forma de biofilme.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MICRORGANISMOS

Neste estudo, foi utilizado um total de 18 cepas de *C. posadasii* (15 humanas e 3 ambientais) e 18 cepas de *H. capsulatum*, na fase filamentosa (14 humanas e 2 animais) (Apêndices A e B). Dentre as quais, para *H. capsulatum*, 10 cepas também foram avaliadas na fase leveduriforme. Todos os isolados analisados fazem parte da Micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Encontravam-se estocados em salina fisiológica à 4 °C ou em ágar Batata dextrose acrescido de DMSO 10% (dimetilsulfóxido, Sigma, USA) à -20 °C. Antes da estocagem, estes isolados passaram por um processo de identificação por meio de técnicas micológicas, imunológicas e moleculares. Para a avaliação da pureza e viabilidade dos isolados retirados do estoque foi realizada a análise micromorfológica após semeadura em ágar Batata e incubação por 7-15 dias a temperatura ambiente (\approx 28 °C). A obtenção de culturas de *H. capsulatum* na fase leveduriforme, foi realizada a partir de culturas na fase filamentosa submetidas a repiques sucessivos em ágar Sabouraud e ágar BHI suplementado com 10% sangue de carneiro e incubação a 35 °C.

5.2 BIOSSEGURANÇA

Todos os procedimentos envolvendo a manipulação laboratorial das cepas foram realizados em cabine de segurança biológica classe II em laboratório de biossegurança nível 3 (NB-3), em virtude da alta virulência das espécies fúngicas trabalhadas (SUTTON, 2007; HALL et al., 2008).

5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *C. POSADASII*

5.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Para o procedimento, os 18 isolados de *C. posadasii* foram repicados em ágar Batata e incubados a 35 °C por 7 dias. Em seguida, as culturas foram inativadas pelo calor, sob vapor fluente em autoclave, a 100 °C por 15 min. Para garantia do processo de inativação, uma porção da colônia foi repicada em meio BHI em caldo e incubada a 35 °C, o restante da amostra foi estocada em freezer a -20 °C. A amostra foi considerada segura para prosseguir com o isolamento de DNA se após o período de sete

dias de incubação o controle de esterilidade não apresentasse nenhum crescimento (BURT et al. 1995; CASTAÑÓN-OLIVARES et al., 2007).

O DNA genômico foi extraído utilizando o detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) juntamente com o agente redutor betamercaptoetanol. O complexo ácido nucléico/CTAB foi separado das proteínas desnaturadas, polissacarídeos e debris celulares pela exposição a clorofórmio/álcool isomílico (24:1). A precipitação dos ácidos nucléicos foi realizada utilizando álcool isopropílico 100%, em seguida, o CTAB foi removido através da lavagem em etanol 70%. Por fim, o precipitado de DNA foi seco ao ar brevemente em temperatura ambiente e ressuspensão em tampão TE pH 8 (TALBOT, 2001). As amostras de DNA foram mantidas em freezer a -20 °C, até o momento do uso. O protocolo completo para extração de DNA genômico de *C. posadasii* encontra-se descrito no Anexo I.

5.3.2 RAPD-PCR

A técnica de RAPD foi realizada utilizando o *primer* 5' GTT TCG CTC C 3', de acordo com o protocolo descrito por Zancopé-Oliveira et al., (2005). As reações foram realizadas num volume final de 10 uL, compreendido de 50 ng de DNA, 1X de tampão de reação *Green GoTaq* (Promega, USA), 1 mM MgCl₂, 2 pmol de *primer*, 0.5mM de dNTP's e 1U/μL de Taq polimerase *Hot Start* (Promega, USA). Controles negativos sem DNA foram simultaneamente submetidos a amplificação. O ciclo de amplificação realizado foi de 95 °C durante 5 minutos para desnaturação inicial, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, seguida de anelamento a 36 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos. Foi realizada uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos. Os produtos amplificados foram analisados por electroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

5.3.3 M13-PCR *FINGERPRINTING*

A técnica M13 *fingerprinting* foi utilizada de acordo com a metodologia descrita por Muniz et al. (2010). Desta forma, a sequência específica do fago M13 tipo selvagem (5' GAG GGT GCG GGT TCT 3') foi utilizada como *primer*. As reações de amplificação foram realizadas com 10 uL de MIX-PCR contendo 50 ng de DNA, 1X de tampão de reação *Green GoTaq* (Promega, USA), 1 mM de MgCl₂, 2 pmol de *primer*, 0,5 mM de dNTP's e 1U/μL de Taq polimerase *Hot Start* (Promega, USA). As

amplificações foram realizadas utilizando 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 20 segundos, seguidos de anelamento a 50 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 20 segundos. Por fim, uma extensão final a 72 °C durante 6 minutos. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

5.4. FARNESOL E AGENTES ANTIFÚNGICOS

As soluções de farnesol utilizadas foram preparadas no momento do uso a partir de uma solução comercial (farnesol 95%, *mixture of isomers* - Sigma-Aldrich, USA), utilizando DMSO 30% como solvente. No teste com combinações de farnesol e os antifúngicos: anfotericina B (AMB) (Sigma Chemical Corporation, USA), itraconazol (ITR) (Janssen Pharmaceutica, Bélgica), voriconazol (VRZ) (Pfizer Pharmaceuticals, USA) e caspofungina (CAS) (Merck Sharp & Dohme, Brasil). As soluções-estoque dos antifúngicos foram diluídas em DMSO a 100%, exceto para caspofungina em que foi utilizada água destilada estéril. Para o uso nos testes subsequentes, todas as concentrações utilizadas foram preparadas em RPMI 1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio (Sigma, USA), tamponado a pH 7.0 com MOPS (ácido 3-[N-morfolino]-propanosulfônico) 0,165 M (Sigma, USA).

O intervalo de concentração de farnesol avaliado nos testes de sensibilidade foi determinado experimentalmente em “testes pilotos”. Para o teste utilizando combinações de farnesol com os antifúngicos a concentração inicial dos antifúngicos no primeiro tubo da série foi baseada na CIM encontrada previamente para cada droga isolada.

5.5 EFEITO INIBITÓRIO *IN VITRO* DE FARNESOL ANTE *C. POSADASII*

5.5.1 TESTE DE SENSIBILIDADE

A sensibilidade das cepas de *C. posadasii* ao farnesol e a suas combinações com as drogas antifúngicas, foi determinada através do método de macrodiluição em caldo, conforme protocolo M38-A2 padronizado pelo CLSI (CLSI, 2008b), seguindo as adaptações utilizadas por Cordeiro et al., 2006b. O intervalo concentração de farnesol (FOH) testado foi de 0,0009 a 0,2464 µM. As combinações de drogas foram testadas nos intervalos de concentração a seguir, variando em µM de 0,00003 a 0,0616 para

FOH e em $\mu\text{g/mL}$ para AMB de 0,0039 a 0,125, para ITR de 0,0156 a 0,5, para VRZ de 0,00278 a 0,25 e para CAS de 2 a 32.

5.5.1.1 Inóculo Fúngico

Nos testes a seguir o inóculo foi realizado a partir de culturas de *C. posadasii* semeadas em ágar Batata e incubadas por 7-10 dias a 35 °C. No preparo do inóculo foi adicionado a cada cultura 1 mL de solução salina fisiológica (0,9%) estéril e em seguida, a superfície do micélio foi raspada com auxílio de um garfo microbiológico, a fim de trazer em suspensão artroconídios e fragmentos de hifas. Cada suspensão fúngica foi transferida para outro tubo estéril e ajustada com solução salina fisiológica a escala 0,5 de McFarland. A leitura dessas suspensões fúngicas em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 530 nm, corresponde a transmitância de 95%. Em seguida, as suspensões fúngicas foram submetidas a agitação em vórtex por 5 segundos e deixadas decantar espontaneamente por cerca de 5 minutos, até que os pedaços maiores de micélio se depositassem no fundo do tubo. Subsequentemente, cada suspensão foi diluída na proporção de 1:10 em meio RPMI 1640 para obtenção de um inóculo final de 1 a 5×10^3 UFC mL^{-1} (CORDEIRO et al., 2006b).

5.5.1.2 Ensaio de Macrodiluição

O meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 165 mM a pH 7,0, foi utilizado como meio para realização do ensaio. Para tanto, foram distribuídos 100 μL de RPMI em tubos, que em seguida foram organizados em séries de 5. A cada primeiro tubo da série 100 μL da droga ou combinação de drogas foi adicionado e diluído seriadamente até o quinto tubo, desprezando os 100 μL finais. A cada tubo da série foi adicionado 900 μL do inóculo previamente descrito. Todos os procedimentos foram realizados em duplicata. Como controle de crescimento de cada cepa, foram utilizados tubos inoculados em RPMI sem a adição de droga. As leituras foram realizadas visualmente após incubação a 35 °C, por um período de 48 horas, sem agitação. Para controle de qualidade do teste foi utilizada uma cepa de *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) (CORDEIRO et al., 2009b).

5.5.1.3 Determinação de CIM e FICI

A CIM das drogas foi definida como a menor concentração de farnesol e dos antifúngicos isolados ou em combinação capaz de inibir em 80 % o crescimento fúngico em relação ao tubo controle livre de droga. Exceto para anfotericina B isolada onde a CIM considerada foi de 100% de inibição (CORDEIRO et al., 2009a). A avaliação da interação entre as drogas em combinação foi realizada através do cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI), obtido através da soma das frações resultantes entre a CIM de cada droga em combinação e a CIM da mesma droga isolada, onde valores menores ou iguais a 0,5 são indicativos de sinergismo, maiores que 4,0 de antagonismo e entre 0,5 e 4,0 indiferentes. (ODDS, 2003). Ademais, as diferenças entre as CIM's das drogas isoladas e em combinação, foram avaliadas por meio do teste *t* de Student, no qual os valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5.5.4 FARNESOL E A CONCENTRAÇÃO DE ERGOSTEROL

O ergosterol celular foi obtido de acordo com a metodologia de Arthington-Skaggs (1999), com adaptações. A extração de ergosterol foi realizada após a exposição de 10 cepas de *C. posadasii* a concentrações sub-inibitórias de farnesol pela técnica de macrodiluição, seguindo a metodologia supracitada. Para tanto, utilizou-se concentrações \leq a CIM, previamente obtida, para iniciar a série de diluições. Sete concentrações foram testadas, no intervalo de 0,00006-0,0156 μ M para farnesol e 0,00195-0,125 μ g/mL para itraconazol que foi utilizado como droga controle. O conteúdo de cada tubo de macrodiluição foi transferido para microtubos e centrifugado a 10.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido, referente a cada concentração de droga testada, foi exposto a 0,5 mL de KOH/EtOH (20%/60%). Em seguida, as amostras foram colocadas em Banho Maria a 95 °C durante 1h. Após esse período 0,5 mL de hexano foi adicionado as amostras de modo a isolar os esteróis presentes. As soluções foram centrifugadas a 10.000 x g durante dois minutos. Em seguida, toda a camada superior de hexano foi transferida para outro microtubo e ao qual foi adicionado mais 0,5 mL de hexano. As amostras foram agitadas em vórtex por alguns segundos. A leitura da absorbância ($\lambda = 295,10$ nm) foi realizada em espectrofotômetro e comparada com uma curva padrão predeterminada. Para controle

positivo foi realizada a extração de *C. posadasii* semeado em meio RPMI sem adição da droga.

5.5.5 FARNESOL NA PRESENÇA DE ESTRESSE OSMÓTICO

A capacidade do farnesol em alterar a permeabilidade da membrana fúngica também foi avaliada em ensaio de microdiluição. Contudo, para induzir o estresse osmótico seguiu-se uma metodologia adaptada de Coleman et al., (2010), onde o meio RPMI 1640 tamponado a pH 7,0 foi acrescido de NaCl. Para determinar a concentração de NaCl adequada para o estudo, o meio RPMI+Sal foi diluído seriadamente no intervalo de 0,0021 a 5M. Em seguida, o inóculo em RPMI padrão foi adicionado e os tubos foram incubados a 35 °C por 48h. Desta forma, foi possível observar, que concentrações de NaCl $\leq 0,175M$ não interferem no crescimento de *C. posadasii*, que apresentou crescimento comparável ao tubo controle de RPMI padrão. Com base nessa informação concentrações sub-CIM de farnesol foram testadas ante 10 cepas de *C. posadasii*.

Para que a concentração de NaCl não variasse seriadamente junto com a droga, primeiramente, apenas 50 μL de RPMI padrão foi adicionado aos tubos e em seguida 50 μL da droga foi diluída seriadamente, sendo descartado os 50 μL finais. Em seguida, 50 μL de RPMI+Sal foram adicionados a todos os tubos da série, chegando a concentração final de 0,175M após a adição do inóculo em RPMI padrão. Um controle de crescimento livre de droga em RPMI padrão e em RPMI+Sal foi realizado para cada cepa. Todas as cepas foram testadas em duplicata. A leitura foi realizada visualmente após 48h de incubação a 35 °C. A CIM foi definida como a menor concentração de FOH capaz de inibir o crescimento fúngico em 80% em comparação ao controle livre de droga.

5.6 EFEITO INIBITÓRIO *IN VITRO* DE FARNESOL ANTE *H. CAPSULATUM*

5.6.1 TESTE DE SENSIBILIDADE

A sensibilidade das cepas de *H. capsulatum* foi avaliada por meio do método de microdiluição em caldo, conforme descrito no protocolo M27-A3 padronizado pelo CLSI (CLSI, 2008b), seguindo as adaptações utilizadas por Brilhante et al., 2010. O efeito do inibitório do farnesol isolado foi testado ante a fase filamentosa e

leveduriforme e em combinações com os antifúngicos anfotericina B e itraconazol, O intervalo de concentração testado para o farnesol isolado variou 0,0009 a 0,5 μM em ambas as fases. Para as combinações o intervalo testado foi de 0,00003 a 0,0156 μM para farnesol, de $< 0,000001$ a 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ para itraconazol e de 0,0009 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B.

5.6.1.1 Inóculo Fúngico

Para o procedimento, 18 cepas de *H. capsulatum* na fase filamentosa foram cultivadas em ágar BHI e incubadas por 7 dias a 28 °C. Na fase leveduriforme, foram utilizadas 10 cepas semeadas em ágar BHI suplementado com sangue de carneiro (10%), com incubação de 7 dias a 35 °C. Para ambas as fases uma suspensão fúngica da colônia de cada cepa foi preparada em salina fisiológica (0,9%) estéril. Estas suspensões foram ajustadas na escala 0,5 de McFarland, que por espectrofotometria a 530 nm corresponde a uma transmitância de 90-95%, e em seguida, homogeneizadas em vórtex por 5 segundos. As culturas na fase filamentosa foram deixadas decantar espontaneamente por cerca de 5 minutos, até que os pedaços maiores de micélio se depositassem no fundo do tubo. Por fim, cada suspensão foi diluída na proporção de 1:10 em meio RPMI 1640, tamponado com MOPS 0,156M a pH 7,0, para obtenção de um inóculo de aproximadamente $0,5 \times 10^3$ e $2,5 \times 10^4$ UFCmL⁻¹ (BRILHANTE et al., 2010).

5.6.1.2 Ensaio de Microdiluição

O meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 165 mM a pH 7,0, foi utilizado como meio para realização do ensaio. O teste foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços com fundo em U. A cada poço da placa foram distribuídos 100 μL de RPMI. Em seguida, foi determinado que cada linha da placa fosse correspondente a uma série de 10 poços. Assim, a cada primeiro poço da série foi adicionado 100 μL da droga isolada ou combinação e subsequentemente diluído seriadamente até o décimo poço, desprezando os 100 μL finais. Por fim, a cada poço da série foi adicionado 100 μL do inóculo previamente descrito. Para cada cepa testada, os controles positivos de crescimento foram realizados por meio da adição do inóculo em poços com RPMI livre de droga. Todos os procedimentos foram realizados em duplicata. Como controle de qualidade do teste uma cepa de *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), também foi

incluída. Os resultados foram obtidos visualmente após incubação a 35 °C, no intervalo de 7 dias para fase filamentosa e de 4 dias para fase leveduriforme (BRILHANTE et al., 2010).

5.6.1.3 Determinação de CIM e FICI

A CIM da anfotericina B isolada foi considerada a menor concentração da droga em que não foi detectado crescimento fúngico visível. Para itraconazol e farnesol, bem como, para todas as combinações de drogas a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir em 80 % do crescimento fúngico em relação ao tubo controle livre de droga. A interação entre as combinações de drogas foi avaliada através do cálculo do FICI, como descrito anteriormente (BRILHANTE et al., 2010).

5.6.2 FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *H. CAPSULATUM*

O ensaio foi baseado no protocolo descrito por Pitangui et al. (2012) com ligeiras modificações. Inicialmente, a 50 µL de uma suspensão fúngica em salina fisiológica de concentração de 2,4 a 5,5 x 10⁶ células / mL foi adicionada aos poços de uma placa de fundo chato de 96 poços (TPP®, Trasadingen, Suíça). As placas foram incubadas num agitador orbital a 80 rpm, durante 24 h, a 35 °C para pré-adesão celular. Após esse período, o sobrenadante foi removido de cada poço, em seguida, 200 µL de meio BHI em caldo foi adicionado a cada poço e as placas foram incubadas por mais 7 dias, sob agitação de 120 rpm a 35 °C, para adesão e maturação do biofilme.

5.6.2.1 TESTE DE SENSIBILIDADE *IN VITRO* EM BIOFILME

Subsequente aos 7 dias de maturação do biofilme de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com 200 µL de solução salina fisiológica. Em seguida, foram adicionados aos poços da placa 200 µL de diferentes concentrações dos compostos farnesol, itraconazol e anfotericina B, isolados e em combinação. As diferentes concentrações testadas para estas drogas variaram de 1,5 a 100 vezes a maior que a CIM obtida para estas droga contra *H. capsulatum* var. *capsulatum* no teste com células planctônicas. Os controles positivos foram realizados adicionando apenas de meio BHI em caldo a poços do biofilme maduro. Os resultados foram obtidos após 4 dias, seguindo os mesmo parâmetros de incubação citados anteriormente.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 590 nm através da coloração com cristal violeta. Para tanto, os poços foram lavados com PBS acrescido de Tween 0,05%, seguida da exposição a metanol 100% para fixação. Após a retirada e secagem do fixador, uma solução de cristal violeta 0,3% foi adicionada aos poços e mantida por 20 min. Após sucessivas lavagens em água destilada, uma solução de ácido acético 33% foi adicionada aos poços previamente corados. Subsequentemente, o conteúdo de cada placa foi transferidos para uma placa “espelho”, a qual foi imediatamente submetida a leitura colorimétrica. Todos os testes foram realizados em duplicata e em todos os ensaios poços contendo apenas BHI em caldo foram incluídos como controles negativos.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *C. POSADASII*

Os resultados obtidos pelas técnicas de RAPD e M13 *fingerprinting* mostraram que as cepas de *C. posadasii* avaliadas apresentam perfis eletroforéticos similares, indicando baixo polimorfismo entre os isolados. Especialmente, na amplificação com *primer* M13, onde padrão de bandas foi idêntico para todas as cepas. Um padrão de RAPD e M13 *fingerprinting* representativos são mostrados na figura 12 A e B.

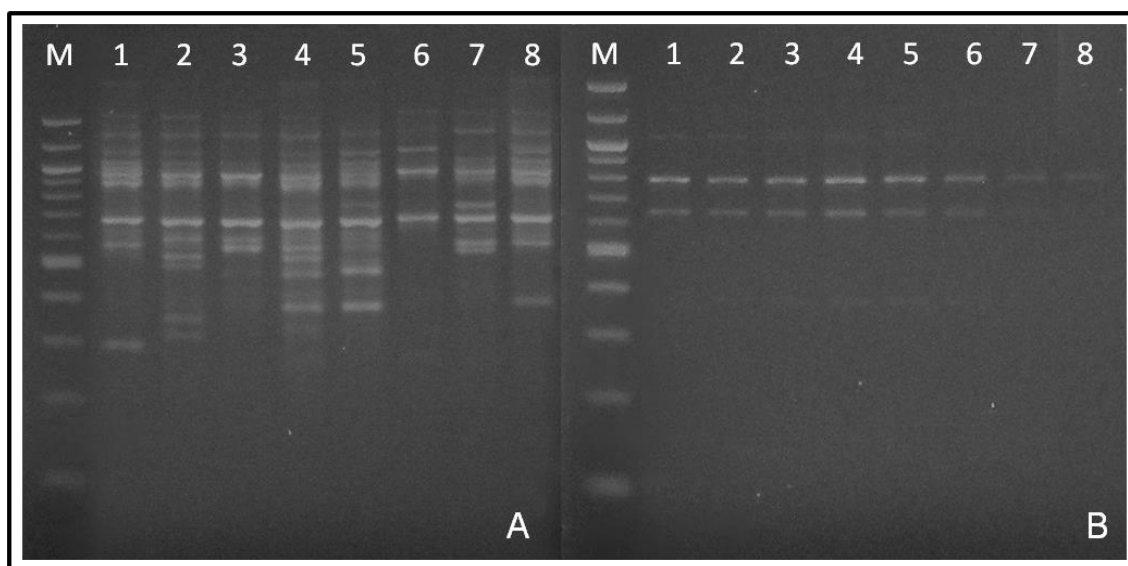


Figura 12. Gel de agarose 2% mostrando o padrão de RAPD (A) e M13 *fingerprinting* (B) obtido de 8 isolados de *C. posadasii* (M: marcador de peso molecular 100pb; Colunas 1. CEMM 05-2-064; 2. CEMM 05-2-065; 3. CEMM 05-2-066; 4. CEMM 05-2-067; 5. CEMM 05-2-069; 6. CEMM 01-6-085; 7. CEMM 01-6-101 e 8. CEMM 01-6-103).

6.2 EFEITO INIBITÓRIO *IN VITRO* DE FARNESOL ANTE *C. POSADASII*

6.2.1 TESTE DE SENSIBILIDADE

Todas as cepas de *C. posadasii* analisadas foram inibidas por baixas concentrações farnesol, apresentando CIM's que variaram de 0,0078-0,0616 μM , com média geométrica de 0,285 μM . Para as drogas antifúngicas para utilização clínica, os intervalos de MIC encontrados em mg/L foram de 0,0625-0,125 para anfotericina B, de 0,125-0,5 para o itraconazol, de 0,125-0,25 para voriconazol e de 16-32 para caspofungina. Além disso, todas as combinações de drogas testadas foram capazes de inibir o crescimento de *C. posadasii* em concentrações mais baixas, quando comparadas

com as mesmas drogas isoladas. Uma redução significativa da CIM foi encontrada para todos os fármacos testados (casposfungina $P < 0,0001$, itraconazol $P = 0,0016$, anfotericina B $P < 0,0001$ e voriconazol $P = 0,0002$). Um efeito sinérgico estatisticamente significativo foi encontrado para as combinações de farnesol com anfotericina B ($P = 0,0124$) e com casposfungina ($P = 0,0003$), conforme mostrado na Tabela 1 (Apêndice C). Os valores de CIM obtidos para os antifúngicos contra *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram de 0,5 mg/L para o itraconazol e casposfungina, e de 1,0 e 0,03 mg/L para a anfotericina B e voriconazol, respectivamente.

Tabela 1. Valores de CIM e FICI para farnesol e os antifúngicos itraconazol, voriconazol, casposfungina e anfotericina B, isolados e em combinação frente a cepas de *C. posadasii*.

Intervalo CIM Drogas isoladas		Intervalo CIM Drogas em combinação				Intervalo FICI	Sinergismo N° de cepas (%)
FOH μM	Antifúngico mg/L	FOH μM	Antifúngico mg/L	FOH μM	Antifúngico mg/L		
0,0078 - 0,0616	ITR	0,125 - 0,5	0,00048 - 0,0154	ITR	0,0078 - 0,0312	0,125 - 1	12 (66,6%)
	VRZ	0,25 - 0,125	0,00192 - 0,0038	VRZ	0,0156 - 0,125	0,125 - 2	15 (83,3%)
	CAS	32 - 16	0,00048 - 0,0154	CAS	1 - 8	0,125 - 1	17 (94,4%)
	AMB	0,0625 - 0,125	0,00192 - 0,0154	AMB	0,0078 - 0,0312	0,25 - 1	17 (94,4%)

FOH: farnesol; AMB: anfotericina B; ITR: itraconazol; VRZ: voriconazol; CAS: casposfungina.

6.2.2 QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL

Os resultados obtidos mostraram que a exposição das cepas de *C. posadasii* a doses sub-inibitórias de farnesol alterou a quantidade de ergosterol extraído de cada amostra. Foi observado que, as concentrações mais elevadas de farnesol testadas resultaram proporcionalmente em menores quantidades de ergosterol extraído da célula fúngica. Resultados similares foram observados com o antifúngico itraconazol, que conhecidamente age inibindo a biossíntese de ergosterol (Apêndice D). A Figura 13 mostra a média geométrica ($n=10$) da quantidade de ergosterol extraída referente a cada concentração de farnesol ($r^2=0,9422$) e itraconazol ($r^2=0,8377$) testadas, com 10 isolados de *C. posadasii*.

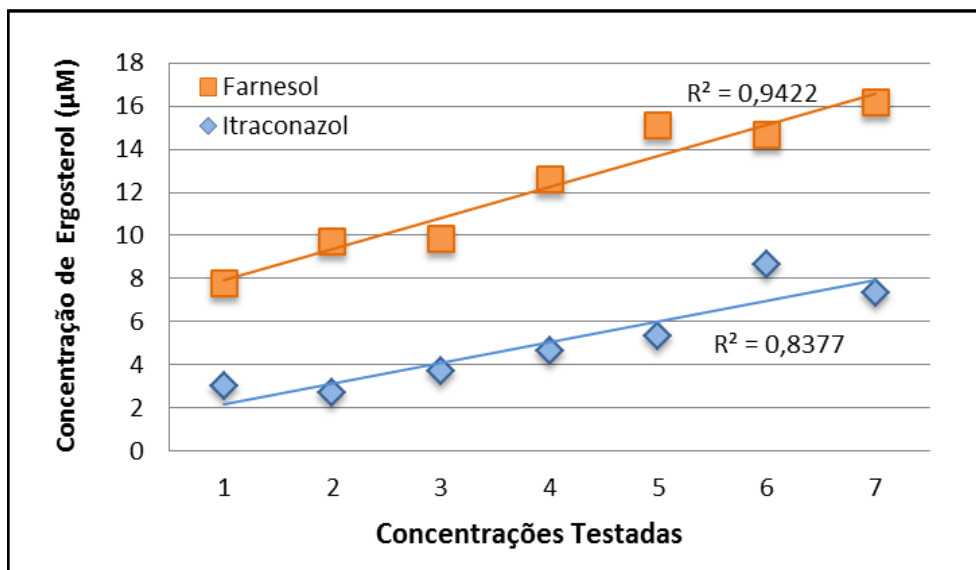


Figura 13. Quantificação do ergosterol em cepas de *C. posadasii* após a exposição a diferentes concentrações de farnesol. Legenda: Farnesol µM (1 - 0,0156; 2 - 0,0078; 3 - 0,0039; 4 - 0,0019; 5 - 0,00048; 6 - 0,00024; 7 - 0,00012); Itraconazol µg/mL (1 - 0,0125; 2 - 0,0625; 3 - 0,0312; 4 - 0,0156; 5 - 0,0078; 6 - 0,0039; 7 - 0,00195).

6.2.3 ESTRESSE OSMÓTICO

Os valores de CIM's obtidos utilizando o meio RPMI acrescido de NaCl, foram significativamente menores quando comparados aos valores de CIM encontrados em meio RPMI padrão, como disposto a seguir na Figura 14 (Apêndice E). Os resultados de CIM obtidos com itraconazol foi de 0,00012 e 0,25 mg/L para RPMI + NaCl e RPMI-Padrão, respectivamente.

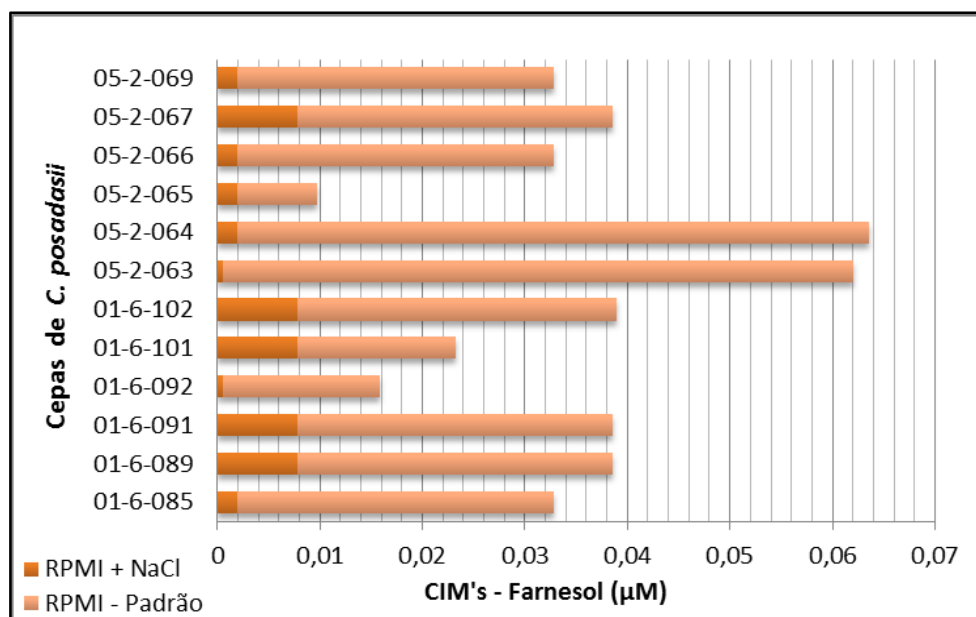


Figura 14. Os valores da Concentração Inibitória Mínima obtidos para farnesol frente a cepas de *C. posadasii* na presença e ausência do estresse osmótico.

6.3 EFEITO INIBITÓRIO *IN VITRO* DE FARNESOL ANTE *H. CAPSULATUM*

6.3.1 TESTE DE SENSIBILIDADE

Todas as cepas de *H. capsulatum* testadas foram inibidas pelo sesquiterpeno farnesol, os valores de CIM's encontrados variaram 0,0078-0,0156 μM para fase filamentosa e de 0,0078-0,0312 μM para fase leveduriforme. Os resultados de CIM apresentaram média geométrica de 0,0128 e 0,0165 μM para fase filamentosa e leveduriforme, respectivamente. As combinações de farnesol com anfotericina B e itraconazol foram capazes de inibir o crescimento de *H. capsulatum* na fase filamentosa em concentrações mais baixas quando comparadas as mesmas drogas isoladas, como exposto na Tabela 2 (Apêndice F). Uma redução significativa da CIM foi mostrada em ambas as associações (anfotericina B $P = 0,002$ e itraconazol $P = 0,0001$). A cepa controle de *C. parapsilosis* ATCC 22019 apresentou CIM de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para itraconazol e 0,03 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B.

Tabela 2. Valores de CIM e FICI para farnesol e os antifúngicos itraconazol e anfotericina B, isolados e em combinação frente a cepas de *H. capsulatum*.

Intervalo CIM		IntervaloCIM				Intervalo FICI	Sinergismo N° de cepas (%)
Drogas isoladas		Drogas em combinação					
FOH μM	Antifúngico mg/L	FOH μM	Antifúngico mg/L	FOH μM	Antifúngico mg/L		
0,0078-0,0312 (leveduriforme)							
0.0078-0,0156 (filamentoso)	ITR 0,00195-0,0625	0,00024-0,0039	ITR 0,00006-0,0078	0,02 -1	15 (83,3%)		
	AMB 0,0156-0,5	0,00048-0,0078	AMB 0,00195-0,125	0,125 - 1	8 (44,4%)		

FOH: farnesol; AMB: anfotericina B; ITR: itraconazol.

6.3.2 BIOFILME

Todos os isolados testados foram capazes de formar biofilme. Os resultados do teste de sensibilidade em biofilme foram avaliados comparando a absorbância apresentada nos poços com diferentes concentrações das drogas avaliadas e a absorbância dos poços controles livres de droga. De acordo com esta observação todas as cepas de *H. capsulatum* em biofilme foram inibidas quando expostas as drogas farnesol, itraconazol e anfotericina B isoladamente, bem como, na combinação de farnesol com itraconazol e farnesol com anfotericina B, exposto na Figura 15 (Apêndice G). As drogas isoladas não apresentaram diferenças significativas quanto ao potencial

de inibição do biofilme. Contudo, as drogas em combinação mostraram efeito inibitório significativamente maior quando comparadas as mesmas drogas isoladas ($P < 0,0001$).

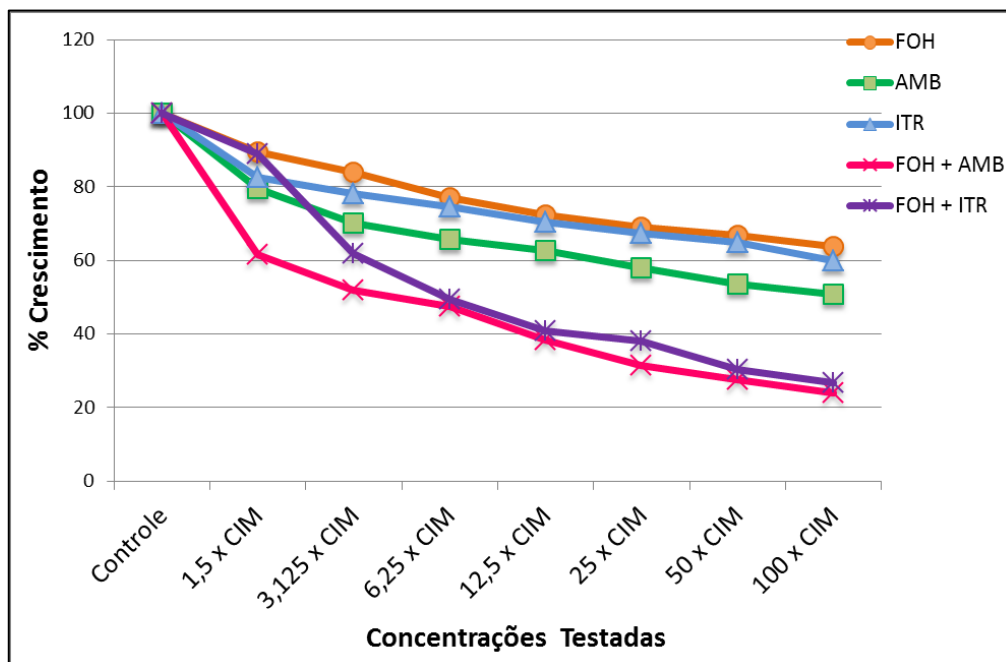


Figura 15. Inibição do crescimento em biofilme, baseada na média geométrica da absorvância de cepas de *H. capsulatum* ante as drogas isoladas farnesol (FOH), anfotericina B (AMB) e itraconazol (ITR) e as combinações de farnesol com anfotericina B (FOH + AMB) e itraconazol (FOH + ITR)

7. DISCUSSÃO

Diferentes abordagens moleculares têm sido utilizadas com objetivo de resolver questões relativas à epidemiologia da coccidioidomicose e inferir sobre a estrutura populacional de *Coccidioides* spp. (NEAFSEY et al., 2010). Os primeiros estudos moleculares das populações de *Coccidioides*, baseados em polimorfismos determinaram uma estrutura populacional dividida em dois grandes grupos geográficos (KOUFOPANOU et al., 1997; FISHER; WHITE; TAYLOR, 1999; FISHER et al., 2002), os quais foram posteriormente determinados como espécies filogenéticas diferentes, *C. immitis* e *C. posadasii* (FISHER et al., 2002). Os estudos de diversidade genética dentro das populações de cada espécie, após a divisão das mesmas, ainda são escassos, principalmente em isolados da América do Sul. O presente estudo avaliou a variabilidade genética de cepas *C. posadasii* oriundas do Brasil, incluindo isolados de origem clínica e ambiental, contribuindo para caracterização da espécie no país.

No presente estudo os resultados obtidos com as técnicas de RAPD e M13 *fingerprinting* demonstraram baixo polimorfismo entre os isolados analisados e não foram detectadas diferenças características entre isolados de origem clínica e ambiental. Assim, a similaridade genética encontrada entre isolados analisados ante estas técnicas sugerem que os isolados brasileiros de *C. posadasii* provêm de uma população predominantemente clonal. Esses resultados corroboram diretamente com os dados relatados por Lima (2010), que demonstrou por meio da análise das regiões ITS1 e ITS2 um reduzido número de SNP's (*Single Nucleotide Polymorphism*) entre as cepas de *C. posadasii* oriundas do Brasil, bem como, quando comparadas com sequências gênicas de cepas de *C. posadasii* depositadas no GenBank provenientes de outros locais do mundo (LIMA, 2010).

Provavelmente, essa homogeneidade encontrada nos isolados brasileiros de *C. posadasii* está relacionada à origem e à demografia da população de *C. posadasii* sul-americana. Estudos anteriores demonstraram por meio de uma análise *multilocus* que a espécie *C. posadasii* apresenta a uma taxa de polimorfismo elevado entre suas populações e as populações de *C. immitis*. Contudo, baixa diversidade genética entre os isolados *C. posadasii*, especialmente da América do Sul, foi observada. Além disso, também foi evidenciado que os genótipos de cepas sul-americanas são idênticos às de vários isolados de *C. posadasii* provenientes do Texas e do México (FISHER et al.,

2001) e apesar de conterem alelos representativos de todas as populações da América do Norte, apresentam frequências alélicas mais estreitamente relacionadas às populações de *C. posadasii* centradas no Texas. Indicando assim, que as cepas sul-americanas são descendentes recentes de uma única população originária deste Estado norte-americano (FISHER et al. 2002).

Estima-se que a introdução da espécie na América do Sul ocorreu nos últimos 9-140.000 anos, sendo recente o suficiente para que a taxa de mutação gênica natural ainda não fosse capaz de restaurar a variabilidade genética para os níveis equivalentes aos de sua população de origem (FISHER et al., 2001). Desta forma, a homogeneidade de genótipos demonstrada entre os isolados brasileiros de *C. posadasii* avaliados no presente estudo, confirma a baixa diversidade de genética entre os isolados sul-americanos e corrobora com o modelo de colonização sugerido para este patógeno na América do Sul, o qual parece ter ocorrido através de um rápido processo de migração, em consonância com o rápido crescimento populacional do patógeno na região.

Por fim, esta análise contribuiu de forma efetiva para melhor compreensão e caracterização genética da população de *C. posadasii* no Brasil. É importante ressaltar, que análises adicionais devem ser realizadas, a fim de obter mais dados para apoiar a constatação da baixa diversidade genética entre os isolados brasileiros de *C. posadasii*, e que estes são resultantes de uma população clonal.

O aumento no número de caso de micoses oportunistas e sistêmicas, associado ao reduzido número de drogas antifúngicas disponíveis, tem motivado a realização de estudos que visam ampliar o arsenal terapêutico antifúngico (BERGOLD; GEORDIADIS, 2004; MARTINEZ, 2006). Na busca por novos compostos com atividade antifúngica, que possam substituir ou subsidiar a terapia convencional, o sesquiterpeno farnesol tem se destacado por seu efeito inibitório sobre o crescimento de microrganismos (INOUE et al., 2004; JABRA-RIZK et al., 2006a; JABRA-RIZK et al., 2006b; SEMIGHINI; MURRAY; HARRIS, 2008; DERENGOWSKI et al., 2009). Atualmente, vários estudos têm confirmado o potencial antifúngico do farnesol frente a diferentes patógenos fúngicos (JABRA-RIZK et al., 2006b; DERENGOWSKI et al., 2009; BRILHANTE et al., 2012c; CORDEIRO et al., 2012; CORDEIRO et al., 2013). Nesse contexto, a atividade antifúngica do farnesol foi investigada pela primeira vez

contra os patógenos primários *C. posadasii* e *H. capsulatum*, agentes causadores da coccidioidomicose e da histoplasmose, respectivamente.

Quanto ao efeito do farnesol ante a espécie *C. posadasii*, os valores de CIM obtidos revelam um elevado potencial na inibição do crescimento, *in vitro*, de todas as cepas testadas, não apresentando valores diferenciais entre as cepas de origem clínica e ambiental. Ante *H. capsulatum*, foi demonstrado que o sesquiterpeno farnesol apresenta atividade antifúngica *in vitro*, tanto para fase filamentosa quanto para fase leveduriforme. Todos os isolados de *H. capsulatum* testados foram inibidos pelo composto não houve diferenças significativas entre os valores de CIM obtidos para ambas as fases. Os resultados obtidos variaram de 0,0078 a 0,0616 μM para *C. posadasii* e de 0,0078 a 0,00312 μM para *H. capsulatum*. Os valores de CIM observados para ambas as espécies avaliadas foram similares aos valores de CIM relatados para outros fungos dimórficos, como as espécies pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*, cujo *S. brasiliensis* e *S. globosa* apresentam CIM que variam de 0,0078 a 0,25 μM e de 0,0312 e 0,25 μM respectivamente. As espécies *S. mexicana* e *S. schenckii* mostram valores de CIM um pouco mais altos, variando de 0,0156 a 0,5 μM e de 0,0312 a 1,0 μM , respectivamente (BARBOSA, 2013).

Em contrapartida, os resultados obtidos no presente estudo frente as espécies *C. posadasii* e *H. capsulatum* são bastante baixos quando comparados aos valores anteriormente descritos para outros patógenos fúngicos como as espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* as quais mostraram valores de CIM que variam de 0,29 a 75 μM (CORDEIRO et al., 2012a). Bem como, ante diferentes espécies do gênero *Candida*, cujo intervalo de CIM relatado varia 9,37 a 150 μM (CORDEIRO et al., 2013). Esta observação indica que o composto farnesol aparentemente possui elevada atividade inibitória frente a fungos dimórficos.

Derengowski et al., (2009) demonstraram a atividade do farnesol, *in vitro*, frente ao também fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, evidenciando a inibição da transição dimórfica ocasionada pelo composto. Os autores relataram que a presença de farnesol resulta na diminuição da transição da fase filamentosa para a fase leveduriforme, assim como, na conversão de levedura para micélio. Através desse estudo, a CIM para *P. brasiliensis* foi estimada em 25 μM . E, apesar do valor apresentado ser mais alto do que o evidenciado para os outros fungos dimórficos

supracitados, vale salientar, que a metodologia utilizada para inferir este resultado não foi baseada na determinação da CIM em testes de sensibilidade em diluição em caldo como os demais estudos abordados (DERENGOWSKI et al., 2009).

No presente estudo, a avaliação das combinações de farnesol e os antifúngicos ante *C. posadasii*, mostrou que farnesol diminuiu significativamente os MICs para itraconazol e voriconazol apresentando sinergismo em 66,6% e 83,3% do isolados analisados, respectivamente, além disso, interagiu sinergicamente com anfotericina B e caspofungina em 94,4% do isolados, em ambas as drogas. Também foi possível evidenciar que combinações de farnesol com antifúngicos itraconazol e anfotericina B mostrou redução nos valores de CIM quando comparadas as essas drogas testadas isoladamente ante *H. capsulatum*. Efeito sinérgico foi evidenciado em 83,3% dos isolados testados para combinação de farnesol e itraconazol e em 44,4% para combinação de farnesol e anfotericina B. Estes resultados corroboram os relatórios previamente descritos na literatura que apontam o farnesol como potencial adjuvante terapêutico, promovendo a reversão da resistência a antimicrobianos ante bactérias e fungos (BREHM-STECHER et al., 2003; JABRA-RIZK et al., 2006; BRILHANTE et al., 2012c; CORDEIRO et al., 2013).

A associação do farnesol com antibacterianos, mostra efeito sinérgico na combinação com gentamicina frente cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes (JABRA-RIZK et al., 2006a), além disso, também foi relatado como responsável por aumentar a sensibilidade de *S. aureus* a ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, as tetraciclina e a vancomicina, bem como, de *Escherichia coli* a polimixina B (BREHM-STECHER et al., 2003). Mais recentemente, Brilhante et al. (2012) mostraram a capacidade do farnesol em aumentar a sensibilidade de isolados de *Burkholderia pseudomallei* a betalactâmicos (BRILHANTE et al., 2012c). A interação do farnesol com um antifúngico foi anteriormente descrita por Jabra-Riszk et al. (2006) ante *Candida dubliniensis* e *C. albicans*, onde a exposição a concentrações progressivas de farnesol reduziram proporcionalmente os valores de CIM obtidos com fluconazol da faixa de resistência (64 µg/mL) para sensíveis (<8 ng/ml), demonstrando um sinergismo entre os dois agente (JABRA-RISZK et al., 2006b). Recentemente, Cordeiro et al. (2013), relataram que o composto farnesol quando combinado com drogas antifúngicas, foi capaz de inverter a resistência *in vitro* de cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* interagindo sinergicamente com anfotericina B, fluconazol,

intraconazol e caspofungina em 94,4 a 100% das cepas de *Candida* spp. resistentes analisadas (CORDEIRO et al., 2013).

Diante de sua atividade antimicrobiana, vários estudos procuram elucidar os possíveis mecanismos de ação do farnesol. Segundo Kuroda et al.(2007), o farnesol aumenta a sensibilidade de cepas MSRA a β -lactâmicos inibindo a biossíntese da parede celular por meio da redução do carreador lipídico C55 livre, causando consequentemente o retardo no transporte de precursores de peptidoglicano, tais como, monômeros de mureína, através da membrana celular bacteriana (KURODA; NAGASAKI; OHTA, 2007). Brilhante et al. (2012) observaram aumento na sensibilidade aos betalactâmicos em cepas de *B. pseudomallei* produtoras de β -lactamases quando associadas ao farnesol reforçando assim a hipótese indicada (BRILHANTE et al., 2012c). Outros estudos mostram que o farnesol inibe a formação de fibras de fibrina em *S. aureus*, inibindo a enzima coagulase, um dos factores de virulência mais característicos da espécie (AKIYAMA et al., 2002; KATSUYAMA et al., 2005a; KATSUYAMA et al., 2005b). Também foi observado que o farnesol apresenta amplo efeito inibitório na atividade de lipases em *S. aureus*, provavelmente por inibir competitivamente o domínio catalítico da enzima (KURODA et al. 2007).

A ação do farnesol frente a células fúngicas, parece ser complexa e pode envolver vários mecanismos. Alguns autores considerando que o composto compartilha com o ergosterol vários precursores em sua via biossintética, têm sugerido que o farnesol age inibindo a síntese do ergosterol, causando alteração na membrana celular (JABRA-RIZK et al., 2006b). Segundo Jabra-Rizk et al. (2006) a integridade da membrana de *C. dubliniensis* e *C. albicans*, após exposição ao farnesol foi alterada tornando a célula fúngica permeável aos compostos exógenos, tais como, brometo de etídio (JABRA-RIZK et al., 2006b). Posteriormente, Rossignol et al. (2007) relataram que a exposição de *C. parapsilosis* ao farnesol tem um grande efeito sobre os genes envolvidos no metabolismo dos lípidos interferindo na expressão dos genes *ERG1*, *ERG25* e *ERG9* necessários à biossíntese do ergosterol. Ademais, em *C. parapsilosis* há evidente polarização de esteróis em células em gemulação, contudo, a exposição ao farnesol interrompe essa polarização na maioria das células, confirmando a capacidade do farnesol em alterar da estruturação lipídica da membrana celular fúngica (ROSSIGNOL et al., 2007).

Por sua vez, no presente estudo, os resultados obtidos corroboram com o exposto acima, uma vez que, foi demonstrado que a concentração de ergosterol celular diminuiu quando as cepas de *C. posadasii* foram expostas ao farnesol, mesmo em doses sub-inibitórias, evidenciando também que quanto maior a concentração de farnesol a qual as células fúngicas foram expostas, menor a quantidade de ergosterol extraído. Tal efeito também foi observado quando houve exposição das células ao azólico itraconazol, que sabidamente inibe a síntese de ergosterol. Sugerindo assim, que os dois agentes atuam de forma similar. Ademais, quando as cepas foram submetidas ao meio com elevada salinidade as CIM obtidas diminuíram consideravelmente, apoiando o indicativo de que o mecanismo de ação deste composto está associado a degeneração da membrana fúngica, uma vez que sob estresse osmótico as células de *C. posadasii* apresentaram maior fragilidade celular.

Vale salientar ainda, que Derengowski et al. (2009) demonstraram que a parede celular de *P. brasiliensis* continuou íntegra após a exposição das células a crescentes concentrações de farnesol, indicando que a ação deste composto não está associado a degeneração da parede celular fúngica (DERENGOWSKI et al., 2009). Outro importante mecanismo do farnesol ante fungos é a indução de apoptose (SEMIGHINI et al. 2006). Em células de *C. albicans* foi demonstrado que a apoptose celular é desencadeada através do farnesol por meio da indução da produção de caspases, pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e comprometer a integridade das mitocôndrias (SHIRTLIFF et al., 2009). Quanto ao impacto do farnesol ante a fatores de virulência fúngica, Cordeiro et al. (2012) demonstraram que o farnesol apresenta baixa influência quanto a produção *in vitro* de proteases e fosfolipases por *C. neoformans* e *C. gattii*, embora uma tendência de diminuição na atividade fosfolipásica tenha sido observada (CORDEIRO et al., 2012). Posteriormente, Cordeiro et al. (2013) observaram que a pré-exposição ao farnesol não alterou a atividade proteásica, mas foi responsável pelo incremento na atividade fosfolipásica em diferentes espécies do gênero *Candida* (CORDEIRO et al., 2013).

Outro aspecto importante abordado no presente trabalho foi baseado no recente demonstração da capacidade da espécie *H. capsulatum* de crescer sob a forma de biofilme. Embora, uma possível associação entre a capacidade do patógeno em formar biofilme e o padrão de adesão das leveduras de *H. capsulatum* em células epiteliais A549 tenha sido relatada, sugerindo também que esse mecanismo pode estar

relacionado com sua habilidade de evitar sistema imunitário celular, mais estudos são necessários para entender melhor o papel desse mecanismo na gravidade e patogênese da histoplasmose (PITANGUI et al., 2012). Até o presente momento, nenhum relato sobre a sensibilidade a agentes antifúngicos de *H. capsulatum* sob a forma de biofilme havia sido descrito. Assim, na ausência de estudos comparativos, exploramos a capacidade de *H. capsulatum* para formar biofilmes *in vitro* em microplacas de poliestireno, para estudar a sensibilidade dos antifúngicos itraconazol e anfotericina B, assim como, para avaliar o efeito inibitório do farnesol isolado e em combinações com estes antifúngicos.

Neste estudo foi observado que as drogas testadas isoladas e em combinação apresentaram efeito inibitório ante ao biofilme de *H. capsulatum*. A capacidade de inibição do biofilme, na concentração de 100x CIM, apresentada para as drogas isoladas foi de 41,99 % para farnesol, 41,32% para itraconazol e 50,14% para anfotericina B. Quanto as combinações, farnesol com itraconazol e farnesol com anfotericina B, apresentaram reduções no crescimento de 76,32% e 78,15%, respectivamente, na concentração de 100x CIM. Vale ressaltar ainda, que nas duas combinações a concentração de 6,25x CIM já foi capaz de inibir de 53,75% do crescimento em biofilme, mostrando atividade antifúngica potencializada pela associação de drogas. Portanto, nossos resultados mostram que as drogas testadas apresentam menor atividade ante *H. capsulatum* em biofilme, uma vez que, apresenta padrão de sensibilidade diferente quando comparado a forma planctônica.

Alguns pesquisadores já relataram a potencial atividade do farnesol frente a patógenos sob a forma de biofilme. Em cepas de *S. aureus* o farnesol foi capaz inibir consideravelmente a formação de biofilme, além disso, a associação de gentamicina com farnesol mostrou eficácia pronunciada, indicando sinergismo para esta combinação de drogas frente ao biofilme maduro (JABRA-RISZK et al., 2006a). O efeito supressor significativo do farnesol também foi relatado na formação de biofilme fúngico de *C. dubliniensis* e *C. albicans* (JABRA-RISZK et al., 2006b). Alguns possíveis mecanismos já foram considerados, Koo et al. (2003) relataram que a exposição a tt-farnesol diminuiu a concentração de polissarídeos extracelulares, produzidos pelo biofilme de *Streptococcus mutans* (KOO et al., 2003). A ação do farnesol também já foi associando a degeneração da membrana celular de células em biofilme, tanto em bactérias quanto em fungos (JABRA-RISZK et al., 2006a; JABRA-RISZK et al., 2006b).

Por fim, quanto à toxicidade, vale salientar que, os valores de CIM obtido para o farnesol ante aos patógenos *C. posadasii* e *H. capsulatum* demonstrado no presente trabalho foram significativamente abaixo do potencial de toxicidade apresentando pelo composto em testes *in vivo*, previamente descritos. Navarathna et al. (2007), demonstraram que a administração, via oral ou intraperitoneal, de 4,4 mg de farnesol teve efeito tóxico insignificante sobre ratos, não apresentando sinais clínicos ou mortalidade dos animais avaliados, independente da via de administração (NAVARATHNA et al., 2007). O MSDS (*Material Safety Data Sheet*) do farnesol mostra que em administração oral a DL₅₀ (Dose Letal 50%) é de 6 e 7,4 mg/kg para ratos e camundongos, respectivamente. Segundo Binet et al. (1972), por via intraperitoneal a DL₅₀ é de 2,95 g/kg para camundongos (BINET et al., 1972). Ademais, Doppalapudi et al. (2007) avaliaram o potencial do farnesol de causar toxicidade genética e demonstraram que este composto apresenta risco genotóxico mínimo para ensaios clínicos em pacientes (DOPPALAPUDI et al., 2007). Atividade alergênica significativa pode ser apresentada em testes epicutâneos com Farnesol 5%, mas não constitui um risco a saúde do indivíduo (SCHNUCH et al., 2004; FROSCH et al., 2005).

Portanto, podemos concluir que o farnesol apresentou resultados promissores na busca por novos agentes com atividade antifúngica frente *C. posadasii* e *H. capsulatum*. Considerando, a baixa toxicidade já anteriormente demonstrada do composto (NAVARATHNA et al., 2007), aliado a seu elevado potencial antifúngico evidenciado frente a cepas de *C. posadasii* e *H. capsulatum in vitro*, bem como, sua ação adjuvante para aumentar a sensibilidade destes patógenos a drogas antifúngicas, o farnesol apresenta uma perspectiva interessante como um possível agente antifúngico ou adjuvante para o tratamento da coccidioidomicose e da histoplasmose. Assim, este trabalho traz perspectivas para a realização de estudos *in vivo* que possam elucidar a ação do farnesol em células hospedeiras. Além disso, este estudo contribuiu para caracterização do perfil de sensibilidade do biofilme de *H. capsulatum in vitro*. Não está claro se a redução da atividade das drogas testadas é devido à produção de material extracelular ou causado por alterações genéticas e bioquímicas nas células fúngicas de *H. capsulatum*, esta é uma área para estudos futuros.

8. CONCLUSÕES

1. A análise molecular de cepas *C. posadasii* do Brasil, mostrou perfis eletroforéticos semelhantes diante das técnicas de RAPD-PCR e M13-PCR *fingerprinting*, indicando um baixo índice de polimorfismo entre os isolados.
2. O sesquiterpeno farnesol demonstrou elevado efeito inibitório *in vitro* ante aos fungos *C. posadasii* e *H. capsulatum* var. *capsulatum*, apresentando valores de CIM inferiores aos evidenciados frente a outros patógenos fúngicos.
3. O efeito inibitório *in vitro* dos agentes antifúngicos foi potencializado pela associação com o farnesol ante *C. posadasii* e *H. capsulatum* var. *capsulatum*.
4. A exposição de *C. posadasii* ao farnesol *in vitro* reduziu a produção de ergoterol celular e alterou a permeabilidade da membrana citoplasmática deixando as células mais susceptíveis ao estresse osmótico.
5. Os isolados de *H. capsulatum* var. *capsulatum* de origem clínica e veterinária, oriundos do Ceará, foram capazes de formar biofilme *in vitro*.
6. Os agentes farnesol, anfotericina B e itraconazol *in vitro* apresentaram menor atividade ante ao biofilme de *H. capsulatum* var. *capsulatum* quando comparada ao potencial de inibição do patógeno em sua forma planctônica.
7. O farnesol em combinação com anfotericina B e com itraconazol potencializou o efeito inibitório destes agentes ante ao biofilme de *H. capsulatum* var. *capsulatum* *in vitro*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDÉ MA, Histoplasmosis. J. Bras. Pneumol. 2009, 35(11):1145-51.

AKIYAMA H, OONO T, HUH WK, YAMASAKI O, OGAWA S, KATSUYAMA M, ICHIKAWA H, IWATSUKI K. Actions of farnesol and xylitol against *Staphylococcus aureus*. Chemotherapy. 2002; 48(3):122-8.

ALLTON DR, RIVARD RG, CONNOLLY PA, MCCALL S, DURKIN MM, BOYD TM, FLANAGAN JP, WHEAT LJ, HOSPENTHAL DR. Detection of Latin American strains of *Histoplasma* in a murine model by use of a commercially available antigen test. Clin Vaccine Immunol. 2010; 17(5):802-6.

ALMASIRAD A, AMANZADEH Y, TAHERI A, IRANSHAHI M Composition of a Historical Rose Oil Sample (*Rosa damascena* Mill., Rosaceae) Journal of Essential Oil Research. 2007; 19(2):110-2.

AMPEL NM, GIBLIN A, MOURANI JP, GALGIANI JN. Factors and outcomes associated with the decision to treat primary pulmonary coccidioidomycosis. Clin Infect Dis. 2009; 48(2):172-8.

ARTHINGTON-SKAGGS BA, JRADI H, DESAI T, MORRISON CJ. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 1999; 37(10):3332-7.

AVILES-SALAS A, QUINTERO-CUADRA Y, CORNEJO-JUÁREZ P. Coccidioidomycosis extrapulmonar. Presentación de un caso y revisión de la literatura. Revista chilena de infectología. 2007; 24(5):398-401.

AZANZA JR, MONTEJO M. Farmacocinética y farmacodinamia. Interacciones y efectos secundarios. Comparación con otras equinocandinas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2008; 26(14):14-20.

BAPTISTA-ROSAS RC, HINOJOSA A, RIQUELME M. Ecological niche modeling of *Coccidioides* spp. in western North American deserts. Ann N Y Acad Sci. 2007; 1111:35-46.

BARBOSA GR. Efeito inibitório *in vitro* de farnesol frente ao complexo *Sporothrix schenckii*. Monografia. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará - UFC, 2013.

BERGOLD AM, GEORGIADIS S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. Visão Acadêmica. 2004; 5(2):159-72.

BIALEK R, ERNST F, DIETZ K, NAJVAR LK, KNOBLOCH J, GRAYBILL JR, SCHAUMBURG-LEVER G. Comparison of staining methods and a nested PCR assay to detect *Histoplasma capsulatum* in tissue sections. Am J Clin Pathol 2002a; 117:597-603.

BIALEK R, FEUCHT A, AEPINUS C, JUST-NÜBLING G, ROBERTSON VJ, KNOBLOCH J, HOHLE R. Evaluation of two nested PCR assays for detection of

Histoplasma capsulatum DNA in human tissue. J. Clin. Microbiol. 2002b, 40(5):1644-7.

BIALEK R, KERN J, HERRMANN T, TIJERINA R, CECEÑAS L, REISCHL U, GONZÁLEZ GM. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen. J Clin Microbiol. 2004; 42(2):778-83.

BINET L, BINET P, MIOCQUE M, MORIN H, PECHERY C, ROUX M. Farnesol, psychosedative and spasmolytic drug. Therapie. 1972; 27(5):893-905.

BINNICKER MJ, BUCKWALTER SP, EISBERNER JJ, STEWART RA, MCCULLOUGH AE, WOHLFIEL SL, WENGENACK NL. Detection of *Coccidioides* species in clinical specimens by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2007; 45(1):173-8.

BLAIR JE, COAKLEY B, SANTELLI AC, HENTZ JG, WENGENACK NL. Serologic testing for symptomatic coccidioidomycosis in immunocompetent and immunosuppressed hosts. Mycopathologia. 2006; 162(5):317-24.

BOHSE ML, WOODS JP. Expression and interstrain variability of the *YPS3* gene of *Histoplasma capsulatum*. Eukaryot Cell. 2007; 6(4):609-15.

BORKOVICH KA, FARRELLY FW, FINKELSTEIN DB, TAULIEN J, LINDQUIST S. Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. Mol Cell Biol. 1989; 9(9):3919-30.

BRANDT ME, WARNOCK DW: *Histoplasma, Blastomyces, Coccidioides*, and other dimorphic fungi causing systemic mycoses. In: MURRAY PR.; BARON EJ, JORGENSEN JH, PFATTER MA, YOLKEN RH. Manual of Clinical Microbiology. 9th edition, Washington, ASM Press. 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 8a edição revista, 2010.

BREHM-STECHER BF, JOHNSON EA. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(10):3357-60.

BRESLAU AM, KUBOTA MY. Continuous *in vitro* cultivation of spherules of *Coccidioides immitis*. J Bacteriol. 1964; 87:468-72.

BRILHANTE RS, FECHINE MA, CORDEIRO RDE A, ROCHA MF, RIBEIRO JF, MONTEIRO AJ, DE LIMA RA, MESQUITA JR, DE CAMARGO ZP, SIDRIM JJ. *In vitro* effect of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(9):3978-9.

BRILHANTE RS, FECHINE MA, MESQUITA JR, CORDEIRO RA, ROCHA MF, MONTEIRO AJ, LIMA RA, CAETANO ÉP, PEREIRA JF, CASTELO-BRANCO DS, CAMARGO ZP, SIDRIM JJ. Histoplasmosis in HIV-positive patients in Ceará, Brazil: clinical-laboratory aspects and *in vitro* antifungal susceptibility of *Histoplasma capsulatum* isolates. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012b; 106(8):484-8.

BRILHANTE RS, RIBEIRO JF, LIMA RA, CASTELO-BRANCO DS, SOARES RM, MESQUITA JR, GRANGEIRO TB, DE CAMARGO ZP, CORDEIRO RA, ROCHA MF, SIDRIM JJ. Evaluation of the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* isolates from north-eastern Brazil. J Med Microbiol. 2012a; 61(Pt 12):1688-95.

BRILHANTE RS, VALENTE LG, ROCHA MF, BANDEIRA TJ, CORDEIRO RA, LIMA RA, LEITE JJ, RIBEIRO JF, PEREIRA JF, CASTELO-BRANCO DS, MONTEIRO AJ, SIDRIM JJ. Sesquiterpene farnesol contributes to increased susceptibility to β -lactams in strains of *Burkholderia pseudomallei*. Antimicrob Agents Chemother. 2012c; 56(4):2198-200.

BURT A, CARTER DA, KLOENIG GL, WHITE TJ, TAYLOR JT. A safe method of extracting DNA from *Coccidioides immitis*. Fungal Genet Newsl 1995; 42, 23.

CAETANO EP. Efeito inibitório *in vitro* de ciprofloxacina isolada e em combinação com antifúngicos frente a *Coccidioides posadasii* e *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica - PPGMM, Universidade Federal do Ceará - UFC, 2010.

CASTAÑÓN-OLIVARES LR, AROCH-CALDERÓN A, BAZÁN-MORA E, CÓRDOVA-MARTÍNEZ E. Coccidioidomycosis y su escaso conocimiento en nuestro país. Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. 2004; 47(4):145-8.

CASTAÑÓN-OLIVARES LR, GÜEREÑA-ELIZALDE D, GONZÁLEZ-MARTÍNEZ MR, LICEA-NAVARRO AF, GONZÁLEZ-GONZÁLEZ GM, AROCH-CALDERÓN A. Molecular identification of *Coccidioides* isolates from Mexican patients. Ann N Y Acad Sci. 2007; 1111:326-35.

CASTELUCCI S, DE PAULA ROGERIO A, AMBROSIO SR, ARAKAWA NS, DE LIRA SP, FACCIOLI LH, DA COSTA FB. Anti-inflammatory activity of *Dasyphyllum brasiliensis* (Asteraceae) on acute peritonitis induced by beta-glucan from *Histoplasma capsulatum*. J Ethnopharmacol. 2007; 30;112(1):192-8.

CATALÁN M, MONTEJO JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. Revista Iberoamericana de Micología. 2006; 23:39-49.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention, 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/fungal/>. Acessado em setembro de 2013.

CHANDRA J, MUKHERJEE PK, GHANNOUM MA. Fungal Biofilms in the Clinical Lab Setting. Curr Fungal Infect Rep. 2010; 4(3):137-44.

CHANDRASEKAR PH, SOBEL JD. Micafungin: a new echinocandin. Clin Infect Dis. 2006; 42(8):1171-8.

CHANG MR, TAIRA CL, PANIAGO AM, TAIRA DL, CUNHA RV, WANKE B. Study of 30 cases of histoplasmosis observed in the Mato Grosso do Sul State, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2007; 49(1):37-9.

CHAPMAN SW, SULLIVAN DC, CLEARY JD. In search of the holy grail of antifungal therapy. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2008;119:197-215.

CHILLER TM, GALGIANI JN, STEVENS DA. Coccidioidomycosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2003; 17(1):41-57.

CHO T, AOYAMA T, TOYODA M, NAKAYAMA H, CHIBANA H, KAMINISHI H, CALDERONE RA. Farnesol as a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2008; 49(4):281-6.

CHOU TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* 2006; 58(3):621-81.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: Norma aprovada, documento – M27-A3, 2008a.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, document M38-A2, 2008b.

COLEMAN JJ, OKOLI I, TEGOS GP, HOLSON EB, WAGNER FF, HAMBLIN MR, MYLONAKIS E. Characterization of Plant-Derived Saponin Natural Products against *Candida albicans*. *ACS Chemical Biology.* 2010; 5(3):321-32.

COLOMBO AL, ALVES SH. Testes de susceptibilidade antifúngicos. *In: SIDRIM JJC, ROCHA MFG. Micologia à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p 50-62, 2004.*

CORDEIRO RA, BRILHANTE RS, ROCHA MF, FECHINE MA, CAMARA LM, CAMARGO ZP, SIDRIM JJ. Phenotypic characterization and ecological features of *Coccidioides* spp. from Northeast Brazil. *Med Mycol.* 2006a; 44(7):631-9.

CORDEIRO RA, BRILHANTE RS, ROCHA MF, FECHINE MA, CAMARGO ZP, SIDRIM JJ. *In vitro* inhibitory effect of antituberculosis drugs on clinical and environmental strains of *Coccidioides posadasii*. *J Antimicrob Chemother.* 2006b; 58(3):575-9.

CORDEIRO RA, BRILHANTE RS, ROCHA MF, FECHINE MA, COSTA AK, CAMARGO ZP, SIDRIM JJ. *In vitro* activities of caspofungin, amphotericin B and azoles against *Coccidioides posadasii* strains from Northeast, Brazil. *Mycopathologia.* 2006c; 161(1):21-6.

CORDEIRO RA, NOGUEIRA GC, BRILHANTE RSN; TEIXEIRA CEC, MOURÃO CI, CASTELO-BRANCO DSCM, ARAUJO NETO PM, RIBEIRO JF, MONTEIRO AJ, SIDRIM JJC, Rocha MFG. Farnesol inhibits *in vitro* growth of the *Cryptococcus neoformans* species complex with no significant changes in virulence-related coenzymes. *Vet. Microbiol.* 2012; 159:375-80.

CORDEIRO RA, TEIXEIRA CE, BRILHANTE RS, CASTELO-BRANCO DS, PAIVA MA, GIFFONI LEITE JJ, LIMA DT, MONTEIRO AJ, SIDRIM JJ, ROCHA

MF. Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. *Med Mycol.* 2013; 51(1):53-9.

CORDEIRO RA. Estratégias para o conhecimento da coccidioidomicose – doença emergente no Nordeste brasileiro. Tese. Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas - PPGCM, Universidade Federal do Ceará – UFC, 2006.

CORDEIRO Rde A, BRILHANTE RS, ROCHA MF, BANDEIRA SP, FECHINE MA, DE CAMARGO ZP, SIDRIM JJ. Twelve years of coccidioidomycosis in Ceará State, Northeast Brazil: epidemiologic and diagnostic aspects. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 66(1):65-72.

CORDEIRO Rde A, BRILHANTE RS, ROCHA MF, MEDRANO DJ, MONTEIRO AJ, TAVARES JL, de LIMA RA, de CAMARGO ZP, SIDRIM JJ. *In vitro* synergistic effects of antituberculous drugs plus antifungals against *Coccidioides posadasii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2009b; 34(3):278-80.

CORDEIRO Rde A, FECHINE MA, BRILHANTE RS, ROCHA MF, DA COSTA AK, NAGAO MA, DE CAMARGO ZP, SIDRIM JJ. Serologic detection of coccidioidomycosis antibodies in northeast Brazil *Mycopathologia.* 2009a; 167(4):187-90.

CORDEIRO Rde A, MARQUES FJ, BRILHANTE RS, ROCHA DE CASTRO E SILVA K, MOURÃO CI, CAETANO EP, FECHINE MA, RIBEIRO JF, CASTELOBRANCO DDE S, DE LIMA RA, MESQUITA JR, MONTEIRO AJ, ROCHA FA, ROCHA MF, SIDRIM JJ. Synergistic effect of antituberculosis drugs and azoles *in vitro* against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(9):4482-4.

COSTA FAM, REIS RC, BENEVIDES F, TOMÉ GS, HOLANDA MA. Coccidioidomycose pulmonar em caçador de tatus. *J Bras Pneumol.* 2001; 27(5):275-8.

COX RA, MAGEE DM. Coccidioidomycosis: host response and vaccine development. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17(4):804-39.

CRUZ R. *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* Darling. *Rev Chilena Infectol.* 2013; 30(3):311-2.

CUSHION MT, COLLINS MS, LINKE MJ. Biofilm formation by *Pneumocystis* spp. *Eukaryot cell* 2009; 8(2):197-206.

CUSTÓDIO DL, VEIGA-JUNIOR VF. True and common balsams. *Rev. bras. farmacogn.* 2012; 22(6):1372-83.

DAHER EF, BARROS FAS, JÚNIOR GBS, TAKEDA CFV, MOTA RMS, FERREIRA MT, MARTINS JC, OLIVEIRA SAJ, GUTIÉRREZ-ADRIANZÉN OA. Risk factors for death in Acquired Immunodeficiency Syndrome-associated disseminated histoplasmosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 74(4):600-3.

DAHER EF, SILVA GB JR, BARROS FA, TAKEDA CF, MOTA RM, FERREIRA MT. Clinical and laboratory features of disseminated histoplasmosis in HIV patients from Brazil. *Trop Med Int Health.* 2007; 12:1108-15.

DAVIS LE, COOK G, COSTERTON JW. Biofilm on ventriculo-peritoneal shunt tubing as a cause of treatment failure in coccidioidal meningitis. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(4):376-9.

DERENGOWSKI LS, DE-SOUZA-SILVA C, BRAZ SV, MELLO-DE-SOUSA TM, BÁO SN, KYAW CM, SILVA-PEREIRA I. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009; 8:13.

DEUS FILHO A, WANKE B, SALMITO CAVALCANTI MDO A, SOARES MARTINS LM, CASTELO BRANCO DE DEUS A. Histoplasmosis in the northeast of Brazil. Report of three cases. *Rev Port Pneumol.* 2009; 15(1):109-14.

DEUS FILHO A. Chapter 2: coccidioidomycosis *J Bras Pneumol.* 2009; 35(9):920-30.

DEVEAU A, PIISPANEN AE, JACKSON AA, HOGAN DA. Farnesol induces hydrogen peroxide resistance in *Candida albicans* yeast by inhibiting the Ras-cAMP signaling pathway. *Eukaryot Cell.* 2010; 9(4):569-77.

DI BONAVENTURA G, POMPILIO A, PICCIANI C, IEZZI M, D'ANTONIO D, PICCOLOMINI R. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(10):3269-76.

DICAUDO DJ. Coccidioidomycosis: a review and update. *J Am Acad Dermatol.* 2006; 55(6):929-42.

DIXON DM. *Coccidioides immitis* as a Select Agent of bioterrorism. *J Appl Microbiol.* 2001; 91(4):602-5.

DOPPALAPUDI RS, RICCIO ES, RAUSCH LL, SHIMON JA, LEE PS, MORTELMANS KE, KAPETANOVIC IM, CROWELL JA, MIRSALIS JC. Evaluation of chemopreventive agents for genotoxic activity. *Mutat Res.* 2007; 629(2):148-60.

DRUTZ DJ, CATANZARO A. Coccidioidomycosis: state of the art. Part II. *Am Rev Respir Dis.* 1978; 177(3):727-71.

DRUTZ DJ, HUPPERT M. Coccidioidomycosis: factors affecting the host-parasite interaction. *J Infect Dis.* 1983; 147(3):372-90

DURKIN M, CONNOLLY P, KUBERSKI T, MYERS R, KUBAK BM, BRUCKNER D, PEGUES D, WHEAT LJ. Diagnosis of coccidioidomycosis with use of the *Coccidioides* antigen enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 47(8):69-73.

EISENBERG T, SEEGER H, KASUGA T, ESKENS U, SAUERWALD C, KAIM U. Detection and characterization of *Histoplasma capsulatum* in a German badger (*Meles meles*) by ITS sequencing and *multilocus* sequencing analysis. *Med Mycol.* 2013; 51(4):337-44.

EL CHAKHTOURA NG, KANAFANI ZA. Current Strategies in Antifungal Therapy for Invasive Aspergillosis in Immunocompromised Patients Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Int J Clin Rev.* 2010; 10:05.

ELIÁS NA, CUESTAS ML, SANDOVAL M, POBLETE G, LOPEZ-DANERI G, JEWTUCHOWICZ V, IOVANNITTI C, MUJICA MT. Rapid identification of *Histoplasma capsulatum* directly from cultures by multiplex PCR. *Mycopathologia* 2012; 174(5-6): 451-6.

ESPINEL-INGROFF A, PFALLER MA: Susceptibility test methods: Yeast and filamentous fungi. *In: MURRAY PR.; BARON EJ, JORGENSEN JH, PFATTER MA, YOLKEN RH. Manual of Clinical Microbiology.* 9th edition, Washington, ASM Press. 2007.

ESPINEL-INGROFF A. *In vitro* antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. *Rev Iberoam Micol.* 2003; 20(4):121-36.

EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2013. Disponível em <http://www.eucast.org/>. Acessado em setembro de 2013

EULÁLIO KD, DE MACEDO RL, CAVALCANTI MA, MARTINS LM, LAZÉRA MS, WANKE B. *Coccidioides immitis* isolated from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Piauí, northeast Brazil. *Mycopathologia.* 2001;149(2):57-61.

FANNING S, MITCHELL AP. Fungal biofilms. *PLoS Pathogens.* 2012; 8(4) e1002585.

FECHINE MBA. Inquérito sorológico em regiões com condições geoclimáticas favoráveis e casos índices de coccidioidomicose no sertão do Ceará. Dissertação. Mestrado em Medicina - Clínica Médica, Universidade Federal do Ceará – UFC, 2005.

FERREIRA MS, BORGES AS. Histoplasmose. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(2):192-8.

FILIPPIN FBSOUZA LC. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de Anfotericina B. *RBCF, Rev. Bras. Ciênc. Farm;* 42(2):167-94

FINQUELIEVICH J, LANDABURU MF, PINONI V, IOVANNITTI CA. Determination of the therapeutic activity of caspofungin compared with the amphotericin B in an animal experimental model of histoplasmosis in hamster (*Mesocricetus auratus*). *Rev Iberoam Micol.* 2011; 28(4):155-8.

FISHER MC, KOENIG GL, WHITE TJ, SAN-BLAS G, NEGRONI R, ALVAREZ IG, WANKE B, TAYLOR JW. Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World patterns of human migration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(8):4558-62.

FISHER MC, KOENIG GL, WHITE TJ, TAYLOR JW. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia*. 2002; 94(1):73-84.

FISHER MC, WHITE TJ, TAYLOR JW. Primers for genotyping single nucleotide polymorphisms and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Mol Ecol*. 1999; 8(6):1082-4.

FROSCH PJ, RASTOGI SC, PIRKER C, BRINKMEIER T, ANDERSEN KE, BRUZE M, SVEDMAN C, GOOSSENS A, WHITE IR, UTER W, ARNAU EG, LEPOITTEVIN JP, JOHANSEN JD, MENNE T. Patch testing with a new fragrance mix - reactivity to the individual constituents and chemical detection in relevant cosmetic products. *Contact Dermatitis*. 2005; 52(4):216-25.

GALGANI JN, AMPEL NM, BLAIR JE, CATANZARO A, JOHNSON RH, STEVENS DA, WILLIAMS PL. Infectious Diseases Society of America. Coccidioidomycosis. *Clin Infect Dis*. 2005; 41(9):1217-23.

GALGANI JN, AMPEL NM, CATANZARO A, JOHNSON RH, STEVENS DA, WILLIAMS PL. Practice guideline for the treatment of coccidioidomycosis. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2000; 30(4):658-61.

GALLIS HA, DREW RH, PICKARD WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis*. 1990; 12(2):308-29.

GANGULY S, MITCHELL AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2011; 14(4):380-5.

GOBERNADO M, CANTÓN E. Anidulafungina. *Revista Española de Quimioterapia*. 2008; 21(2):99-114.

GONZÁLEZ GM. *In vitro* activities of isavuconazole against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. *Med Mycol*. 2009; 47(1):71-6.

GRACE MH. Chemical composition and biological activity of the volatiles of *Anthemis melampodina* and *Pluchea dioscoridis*. *Phytother Res*. 2002; 16(2):183-5.

GUIMARÃES AJ, HAMILTON AJ, De M GUEDES HL, NOSANCHUK JD, ZANCOPE-OLIVEIRA RM. Biological function and molecular mapping of M antigen in yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. *PLoS One*. 2008; 3(10):e3449.

GUIMARÃES AJ, NOSANCHUK JD, ZANCOPE-OLIVEIRA RM. Diagnosis of histoplasmosis. *Braz J Microbiol*. 2006; 37(1):1-13.

HALL L, OTTER JA, CHEWINS J, WENGENACK NL. Deactivation of the dimorphic fungi *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* and *Coccidioides immitis* using hydrogen peroxide vapor. *Med Mycol*. 2008; 46(2):189-91.

HATTON RD, WEAVER CT. Immunology. T-bet or not T-bet. *Science*. 2003; 302(5647):993-4.

HAYDEN RT, QIAN X, ROBERTS GD, LLOYD RV. *In situ* hybridization for the identification of yeastlike organisms in tissue section. *Diagn Mol Pathol*. 2001; 10(1):15-23.

HENINGER E, HOGAN LH, KARMAN J, MACVILAY S, HILL B, WOODS JP, SANDOR M. Characterization of the *Histoplasma capsulatum*-induced granuloma. *J Immunol*. 2006; 177(5):3303-13.

HIBBETT DS, BINDER M, BISCHOFF JF, BLACKWELL M, CANNON PF, ERIKSSON OE, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*. 2007, 111(5):509-547.

HILTY J, GEORGE SMULIAN A, NEWMAN SL. *Histoplasma capsulatum* utilizes siderophores for intracellular iron acquisition in macrophages. *Med Mycol*. 2011; 49(6):633-42.

HOLBROOK ED, RAPPLEYE CA. *Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch. *Curr Opin Microbiol*. 2008; 11(4):318-24.

HORNBY JM, JENSEN EC, LISEC AD, TASTO JJ, JAHNKE B, SHOEMAKER R, DUSSAULT P, NICKERSON KW. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67(7):2982-92.

HOSPENTHAL DR, MURRAY CK, RINALDI MG. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 48(3):153-60.

HUANG W, ZHANG Z, HAN X, TANG J, WANG J, DONG S, WANG E. Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. *Biophys J*. 2002; 83(6):3245-55.

HUNG CY, SESHAN KR, YU JJ, SCHALLER R, XUE J, BASRUR V, GARDNER MJ, COLE GT. A metalloproteinase of *Coccidioides posadasii* contributes to evasion of host detection. *Infect Immun*. 2005; 73(10):6689-703.

HUNG CY, XUE J, COLE GT. Virulence mechanisms of *Coccidioides*. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1111:225-35.

INOUE Y, SHIRAISHI A, HADA T, HIROSE K, HAMASHIMA H, SHIMADA J. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 237(2):325-31.

JABRA-RIZK MA, MEILLER TF, JAMES CE, SHIRTLIFF ME. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006a; 50(4):1463-9.

JABRA-RIZK MA, SHIRTLIFF M, JAMES C, MEILLER T. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. *FEMS Yeast Research*. 2006b; 6(7):1063-73.

JALALI N, NADERI R, SHAHI-GHARAHLAR A, DA SILVA JAT, Tissue culture of *Cyclamen* spp. *Scientia Horticulturae*. 2012; 137(1):11-9.

JEON J-G, PANDIT S, XIAO J, GREGOIRE S, FALSETTA ML, KLEIN MI, KOO H. Influences of trans-trans farnesol, a membrane-targeting sesquiterpenoid, on *Streptococcus mutans* physiology and survival within mixed-species oral biofilms. *Int J Oral Sci*. 2011; 3(2):98–106.

JEONG HW, SOHN JW, KIM MJ, CHOI JW, KIM CH, CHOI SH, KIM J, CHO Y. Disseminated histoplasmosis and tuberculosis in a patient with HIV infection. *Yonsei Med J*. 2007; 48(3):531-4.

JEWELL K, CHESHIER R, CAGE GD. Genetic diversity among clinical *Coccidioides* spp. isolates in Arizona. *Med Mycol*. 2008; 46(5):449-55.

JIANG B, BARTLETT MS, ALLEN SD, SMITH JW, WHEAT LJ, CONNOLLY PA, LEE CH. Typing of *Histoplasma capsulatum* isolates based on nucleotide sequence variation in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(1):241-5.

JOHNSON MD, MACDOUGALL C, OSTROSKY-ZEICHNER L, PERFECT JR, REX JH. Combination Antifungal Therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(3):639-715.

JOHNSON RH, EINSTEIN HE, Amphotericin B and coccidioidomycosis. *Ann NY Acad Sci*. 2007; 1111:434-41.

JOHNSON SM, SIMMONS KA, PAPPAGIANIS D. Amplification of coccidioidal DNA in clinical specimens by PCR. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(5):1982-5.

JOO JH, JETTEN AM. Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer Lett*. 2010; 287(2):123-35.

JÜLG B, ELIAS J, ZAHN A, KÖPPEN S, BECKER-GAAB C, BOGNER JR. Bat-associated histoplasmosis can be transmitted at entrances of bat caves and not only inside the caves. *J Travel Med*. 2008; 15(2):133-6.

KASUGA T, WHITE TJ, KOENIG G, MCEWEN J, RESTREPO A, CASTAÑEDA E, DA SILVA LACAZ C, HEINS-VACCARI EM, DE FREITAS RS, ZANCOPE-OLIVEIRA RM, QIN Z, NEGRONI R, CARTER DA, MIKAMI Y, TAMURA M, TAYLOR ML, MILLER GF, POONWAN N, TAYLOR JW. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol*. 2003; 12(12):3383-401.

KATSUYAMA M, ICHIKAWA H, OGAWA S, IKEZAWA Z. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. *J Dermatol Sci*. 2005b; 38(3):197-205.

KATSUYAMA M, KOBAYASHI Y, ICHIKAWA H, MIZUNO A, MIYACHI Y, MATSUNAGA K, KAWASHIMA M. A novel method to control the balance of skin microflora Part 2. A study to assess the effect of a cream containing farnesol and xylitol on atopic dry skin. *J Dermatol Sci*. 2005a; 38(3):207-13.

- KAUFFMAN CA. Endemic mycoses: blastomycosis, histoplasmosis, and sporotrichosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2006; 20(3):645-62
- KAUFFMAN CA. Histoplasmosis. *Clin Chest Med.* 2009; 30(2):217-25.
- KAUFFMAN CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20(1):115-32.
- KLEIN BS, TEBBETS B. Dimorphism and virulence in fungi. *Curr Opin Microbiol.* 2007; 10(4):314-9.
- KOEPSELL SA, HINRICHS SH, IWEN PC. Applying a real-time PCR assay for *Histoplasma capsulatum* to clinically relevant formalin-fixed paraffin-embedded human tissue. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(10):3395-7.
- KOHLER S, WHEAT LJ, CONNOLLY P, SCHNIZLEIN-BICK C, DURKIN M, SMEDEMA M, GOLDBERG J, BRIZENDINE E. Comparison of the echinocandin caspofungin with amphotericin B for treatment of histoplasmosis following pulmonary challenge in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(7):1850-4.
- KOO H, HAYACIBARA MF, SCHOBEL BD, CURY JA, ROSALEN PL, PARK YK, VACCA-SMITH AM, BOWEN WH. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52(5):782-9.
- KOO H, SCHOBEL B, SCOTT-ANNE K, WATSON G, BOWEN WH, CURY JA, ROSALEN PL, PARK YK. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *J Dent Res.* 2005; 84(11):1016-20.
- KOUFOPANOU V, BURT A, TAYLOR JW. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(10):5478-82.
- KURODA M, NAGASAKI S, ITO R, OHTA T. Sesquiterpene farnesol as a competitive inhibitor of lipase activity of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 273(1):28-34.
- KURODA M, NAGASAKI S, OHTA T. Sesquiterpene farnesol inhibits recycling of the C55 lipid carrier of the murein monomer precursor contributing to increased susceptibility to beta-lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59(3):425-32. *Erratum in:* *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61(1):230.
- KUROKAWA CS, SUGIZAKI MF, PERAÇOLI MT. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1998; 40(3):125-35.
- LACAZ CS, PORTO E, MARTINS JE, HEINS-VACCARI EM, MELO NT. Coccidioidomycose. *In:* _____. *Tratado de micologia médica.* 9 ed., São Paulo: Sarvier, p. 403-15, 2002.

LANGFORD ML, HASIM S, NICKERSON KW, ATKIN AL. Activity and toxicity of farnesol towards *Candida albicans* are dependent on growth conditions. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(2):940-2.

LANIADO-LABORÍN R. Coccidioidomicosis. Más que una enfermedad regional. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México*. 2006; 19(4):301-8.

LANIADO-LABORIN R. Expanding understanding of epidemiology of coccidioidomycosis in the Western hemisphere. *Ann N Y Acad Sci*. 2007b; 1111:19-34.

LANIADO-LABORÍN, R. Coccidioidomycosis and other endemic mycoses in Mexico. *Rev Iberoam Micol*. 2007b; 24:249-58.

LEVY ER, MCCARTY JM, SHANE AL, WEINTRUB PS. Treatment of pediatric refractory coccidioidomycosis with combination voriconazole and caspofungin: a retrospective case series. *Clin Infect Dis*. 2013; 56(11):1573-8.

LIMA RAC. *Coccidioides posadasii* de origem clínica e ambiental: um estudo da diversidade genética. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Ceará, 2010.

LONES GW, PEACOCK CL. Role of carbon dioxide in the dimorphism of *Coccidioides immitis*. *J Bacteriol*. 1960; 79:308-9.

LÓPEZ CE. Dimorfismo y patogenia de *Histoplasma capsulatum*. *Rev Argent Microbiol*. 2006; 38:235-42.

LUMBRERAS C, LIZASOAIN M, AGUADO JM. Antifúngicos de uso sistêmico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; 21(7):366-80.

LYON GM, BRAVO AV, ESPINO A, LINDSLEY MD, GUTIERREZ RE, RODRIGUEZ I, CORELLA A, CARRILLO F, MCNEIL MM, WARNOCK DW, HAJJEH RA. Histoplasmosis associated with exploring a bat-inhabited cave in Costa Rica, 1998-1999. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 70(4):438-42.

MARQUES FJF. Efeito inibitório *in vitro* de Drogas Antituberculose, Antifúngicas e Análogos Químicos da Isoniazida frente a *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Ceará. 2009.

MARTINEZ LR, IBOM DC, CASADEVALL A, FRIES BC. Characterization of phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Mycopathologia* 2008; 166(4), 175-80.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J Bras Pneumol*. 2006; 32(5):449-60.

MEDEIROS JR, CAMPOS LB, MENDONÇA SC, DAVIN LB, LEWIS NG: Composition and antimicrobial activity of the essential oils from invasive species of the Azores, *Hedychium gardnerianum* and *Pittosporum undulatum*. *Phytochemistry*. 2003; 4(2):561-5.

MEDRANO DJA. Perfil de sensibilidade de cepas de *Coccidioides posadasii* a associação de drogas antimicrobianas. Tese. Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Ceará. 2010.

MIHU MR, NOSANCHUK JD. *Histoplasma* virulence and host responses. Int. J. Microbiol. 2012; 1(1):1-5.

MITTELMAN MW. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. J Dairy Sci. 1998; 81(10):2760-4.

MORAIS SS, MAFRA MO, CANTERLE EM, LIMA LL, RIBEIRO SLE. *Histoplasma capsulatum* simulando espondilodiscite tuberculose em doente com artrite reumatóide. Acta Reumatológica Portuguesa. 2008; 33:360-63.

MUKHERJEE A, TANGRI R, VERMA N, GAUTAM D. Chronic disseminated histoplasmosis bone marrow involvement in an immunocompetent patient. Indian J Hematol Blood Transfus. 2010; 26(2):65-7.

MÜLLER FMC, SEIDLER M, BEAUVAIS A. *Aspergillus fumigatus* biofilms in the clinical setting. Med Mycol 2011; 49:96-100.

MUNIZ MDE M, MORAIS E SILVA TAVARES P, MEYER W, NOSANCHUK JD, ZANCOPE-OLIVEIRA RM. Comparison of different DNA-based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum*. Appl Environ Microbiol. 2010; 76(13):4438-47.

MURRAY PR. Agentes antifúngicos. In: _____. Microbiologia médica. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 681-93, 2010b.

MURRAY PR. Patogênese das doenças fúngicas. In: _____. Microbiologia médica. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 661-9, 2010a.

NAKAI T, UNO J, IKEDA F, TAWARA S, NISHIMURA K, MIYAJI M. *In vitro* antifungal activity of Micafungin (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(4):1376-81.

NAVARATHNA DH, HORNBY JM, KRISHNAN N, PARKHURST A, DUHAMEL GE, NICKERSON KW. Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans*. Infect Immun. 2007; 75(4):1609-18.

NEAFSEY DE, BARKER BM, SHARPTON TJ, STAJICH JE, PARK DJ, WHISTON E, HUNG CY, MCMAHAN C, WHITE J, SYKES S, HEIMAN D, YOUNG S, ZENG Q, ABOUELLEIL A, AFTUCK L, BESSETTE D, BROWN A, FITZGERALD M, LUI A, MACDONALD JP, PRIEST M, ORBACH MJ, GALGANI JN, KIRKLAND TN, COLE GT, BIRREN BW, HENN MR, TAYLOR JW, ROUNSLEY SD. Population genomic sequencing of *Coccidioides* fungi reveals recent hybridization and transposon control. Genome Res. 2010; 20(7):938-46.

NEMECEK JC, WÜTHRICH M, KLEIN BS. Global control of dimorphism and virulence in fungi. Science. 2006; 312(5773):583-8.

NEWMAN SL. Macrophages in host defense against *Histoplasma capsulatum*. Trends Microbiol. 1999; 7(2):67-71.

NGUYEN VQ, SIL A. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of *Histoplasma capsulatum* requires *Ryp1*, a conserved transcriptional regulator. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105(12):4880-5.

ODDS FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. J Antimicrob Chemother. 2003; 52(1):1.

PAGANO L, CAIRA M, NOSARI A, VAN LINT MT, CANDONI A, OFFIDANI M, ALOISI T, IRRERA G, BONINI A, PICARDI M, CARAMATTI C, INVERNIZZI R, MATTEI D, MELILLO L, DE WAURE C, REDDICONTO G, FIANCHI L, VALENTINI CG, GIRMENIA C, LEONE G, AVERSA F. Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study--Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. Clin Infect Dis. 2007; 45(9):1161-70.

PAIXÃO GC, ROCHA MFG, SIDRIM JJC. Coccidioidomicose e blastomicose. In: SIDRIM JJC, ROCHA MFG. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.237-51, 2004.

PARK DW, SOHN JW, CHEONG HJ, KIM WJ, KIM MJ, KIM JH, SHIN C. Combination therapy of disseminated coccidioidomycosis with caspofungin and fluconazole. BMC Infect Dis. 2006; 6:26.

PEREIRA JUNIOR HRJ, JORGE W, BAGAGLI E. Por que tatu? Ciência Hoje. 2003; 34(199):70-73.

PERLIN DS. Current perspectives on echinocandin class drugs. Future Microbiol. 2011; 6(4):441-57.

PETKUS AF, BAUM LL, ELLIS RB, STERN M, DANLEY DL. Pure spherules of *Coccidioides immitis* in continuous culture. J Clin Microbiol. 1985; 22(2):165-7.

PETRIKKOS G, SKIADA A. Recent advances in antifungal chemotherapy. Int J Antimicrob Agents. 2007; 30(2):108-17.

PETRONILHO S, MARASCHIN M, DELGADILLO I, COIMBRA MA, ROCHA SM. Sesquiterpenic composition of the inflorescences of Brazilian chamomile (*Matricaria recutita* L.): Impact of the agricultural practices. Industrial Crops and Products. 2011; 34(3):1482-90.

PHILLIPS PL, SCHULTZ GS. Molecular Mechanisms of Biofilm Infection: Biofilm Virulence Factors. Adv Wound Care. 2012; 1(3):109-14.

PITANGUI NS, SARDI JC, SILVA JF, BENADUCCI T, MORAES DA SILVA RA, RODRÍGUEZ-ARELLANES G, TAYLOR ML, MENDES-GIANNINI MJ, FUSCO-ALMEIDA AM. Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. Biofouling. 2012; 28(7):711-8.

QAMAR W, KHAN AQ, KHAN R, LATEEF A, TAHIR M, REHMAN MU, ALI F, SULTANA S. Benzo(a)pyrene-induced pulmonary inflammation, edema, surfactant dysfunction, and injuries in rats: alleviation by farnesol. *Exp Lung Res.* 2012; 38(1):19-27.

QUIST EM, BELCHER C, LEVINE G, JOHNSON M, HEATLEY JJ, KIUPEL M, GIRI D. Disseminated histoplasmosis with concurrent oral candidiasis in an *Eclectus parrot* (*Eclectus roratus*). *Avian Pathol.* 2011; 40(2):207-11.

RAMAGE G, SAVILLE SP, WICKES BL, LÓPEZ-RIBOT JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(11):5459-63.

RAPP RP. Changing strategies for the management of invasive fungal infections. *Pharmacotherapy.* 2004; 24(2 Pt 2):4S-28S.

RAPPLEYE CA, EISSENBERG LG, GOLDMAN WE. *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(4):1366-70.

REICHLING J, SCHNITZLER P, SUSCHKE U, SALLER R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties--an overview *Forsch Komplementmed.* 2009; 16(2):79-90.

RESTREPO, M. A. *Coccidioides immitis* Rixford et Gilchrist 1895, y *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore 1912) Almeida 1930: dos hongos patógenos restringidos al continente americano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc,* 2006; 30(116):367-86.

REX JH, PFALLER MA. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis.* 2002; 35(8):982-9.

RIBEIRO JF. *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: taxa de conversão *in vitro*, detecção do gene *ryp1* e estudo da diversidade genética de cepas brasileiras. Tese Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica - PPGMM, Universidade Federal do Ceará - UFC, 2012.

ROSSIGNOL T, LOGUE ME, REYNOLDS K, GRENON M, LOWNDES NF, BUTLER G. Transcriptional response of *Candida parapsilosis* following exposure to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(7):2304-12.

ROSSINI FT, GOULART LS. Classic histoplasmosis: Review. *RBAC.* 2006; 38(4):275-9.

ROYCE H. JOHNSON, HANS E. EINSTEIN Amphotericin B and Coccidioidomycosis *Ann N Y Acad Sci.* Coccidioidomycosis Sixth International Symposium. 2007; 1111:434-41.

SAUBOLLE MA, MCKELLAR PP, SUSSLAND D. Epidemiologic, clinical, and diagnostic aspects of coccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(1):26-30.

SAUBOLLE MA. Laboratory Aspects in the Diagnosis of Coccidioidomycosis. *Ann NY Acad Sci.* 2007; 1111:301-14.

SCHEIN R, HOMANS J, LARSEN RA, NEELY M. Posaconazole for chronic refractory coccidioidal meningitis. *Clin Infect Dis*. 2011; 53(12):1252-4.

SCHNEE C, KÖLLNER TG, GERSHENZON J, DEGENHARDT J: The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)-beta-farnesene, (E)-nerolidol, and (E, E)-farnesol after herbivore damage. *Plant Physiol*. 2002; 130(4):2049-60.

SCHNUCH A, UTER W, GEIER J, LESSMANN H, FROSCHE PJ. Contact allergy to farnesol in 2021 consecutively patch tested patients. Results of the IVDK. *Contact Dermatitis*. 2004; 50(3):117-21.

SEGURO FS, SILVEIRA PAA. Histoplasmosis. *Einstein*. 2008; 6(3):378-9

SEMIGHINI CP, HORNBY JM, DUMITRU R, NICKERSON KW, HARRIS SD. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Mol Microbiol*. 2006; 59(3):753-64.

SEMIGHINI CP, MURRAY N, HARRIS SD. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and development by farnesol. *FEMS Microbiol Lett*. 2008; 279(2):259-64.

SHARPTON TJ, STAJICH JE, ROUNSLEY SD, GARDNER MJ, WORTMAN JR, JORDAN VS, MAITI R, KODIRA CD, NEAFSEY DE, ZENG Q, HUNG CY, MCMAHAN C, MUSZEWSKA A, GRYNBERG M, MANDEL MA, KELLNER EM, BARKER BM, GALGIANI JN, ORBACH MJ, KIRKLAND TN, COLE GT, HENN MR, BIRREN BW, TAYLOR JW. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Res*. 2009; 19(10):1722-31.

SHIRTLIFF ME, KROM BP, MEIJERING RA, PETERS BM, ZHU J, SCHEPER MA, HARRIS ML, JABRA-RIZK MA. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(6):2392-401.

SIMON S, VERON V, BOUKHARI R, BLANCHET D, AZNAR C. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 66(3):268-73.

STEVENS DA, RENDON A, GAONA-FLORES V, CATANZARO A, ANSTEAD GM, PEDICONE L, GRAYBILL JR. Posaconazole therapy for chronic refractory coccidioidomycosis. *Chest*. 2007; 132(3):952-8.

SUÁREZ-ALVAREZ RO, PÉREZ-TORRES A, TAYLOR ML. Adherence patterns of *Histoplasma capsulatum* yeasts to bat tissue sections. *Mycopathologia*. 2010; 170(2):79-87.

SUN SH, HUPPERT M, VUKOVICH KR. Rapid *in vitro* conversion and identification of *Coccidioides immitis*. *J Clin Microbiol*. 1976; 3(2):186-90.

SUTTON DA. Diagnosis of coccidioidomycosis by culture: safety considerations, traditional methods, and susceptibility testing. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1111:315-25.

TALBOT NJ. Nucleic acid isolation and analysis. *In*: TALBOT NJ. Molecular and Cellular Biology of Filamentous Fungi. New York, Oxford University Press, p.23-31, 2001.

TEIXEIRA CEC. Efeito do farnesol sobre o fenótipo de resistência e a produção de fosfolipase e protease em cepas de *Candida* spp. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica - PPGMM, Universidade Federal do Ceará - UFC, 2011.

THOMPSON GR, CADENA J, PATTERSON TF. Overview of antifungal agents. *Clin Chest Med*. 2009; 30(2):203-15.

TINTELNOT K, DE HOOG GS, ANTWEILER E, LOSERT H, SEIBOLD M, BRANDT MA, VAN DEN ENDE AH, FISHER MC. Taxonomic and diagnostic markers for identification of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. *Med Mycol*. 2007; 45(5):385-93.

TOGASHI RH, AGUIAR FM, FERREIRA DB, MOURA CM, SALES MT, RIOS NX. Pulmonary and extrapulmonary coccidioidomycosis: three cases in an endemic area in the state of Ceará, Brazil. *J Bras Pneumol*. 2009; 35(3):275-9.

UNTEREINER WA, SCOTT JA, NAVEAU FA, SIGLER L, BACHEWICH J, ANGUS A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. *Mycologia*. 2004; 96(4):812-21.

VAN KOEVERINGE MP, BROUWER RE. *Histoplasma capsulatum* reactivation with haemophagocytic syndrome in a patient with chronic lymphocytic leukaemia. *Neth J Med*. 2010; 68(12):418-21.

VERAS KN, FIGUEIRÊDO BCS, MARTINS LMS, VASCONCELOS JTP, WANKE B. Coccidioidomycosis: an unusual cause of acute respiratory distress syndrome. *J Bras Pneumol*. 2003; 29(1):45-48.

WANKE B, LAZÉRA M. Histoplasmose clássica e africana. *In*: SIDRIM JJC, ROCHA MFG. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 222-251, 2004.

WELSH O, VERA-CABRERA L, RENDON A, GONZALEZ G, BONIFAZ A. Coccidioidomycosis. *Clin Dermatol*. 2012; 30(6):573-91.

WHEAT LJ, CONNOLLY P, SMEDEMA M, DURKIN M, BRIZENDINE E, MANN P, PATEL R, MCNICHOLAS PM, GOLDMAN M. Activity of newer triazoles against *Histoplasma capsulatum* from patients with AIDS who failed fluconazole. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57(6):1235-9.

WHEAT LJ, CONNOLLY P, SMEDEMA M, ROGERS PD Antifungal Drug Resistance in Histoplasmosis. *Antimicrobial Drug Resistance Infectious Disease*. Humana Press, 2009; 987-92.

WHEAT LJ, FREIFELD AG, KLEIMAN MB, BADDLEY JW, MCKINSEY DS, LOYD JE, KAUFFMAN CA; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice

guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2007; 45(7):807-25.

WHEAT LJ. Nonculture diagnostic methods for invasive fungal infections. *Curr Infect Dis Rep*. 2007; 9(6):465-71.

WOODS JP. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. *Fungal Genet. Biol*. 2002; 35(2):81-97.

WOODS, J.P. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol*. 2003; 6(4):327-31.

YU LH, WEI X, MA M, CHEN XJ, XU SB. Possible inhibitory molecular mechanism of farnesol on the development of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(2):770-5.

ZANCOPE-OLIVEIRA RM, MORAIS E SILVA TAVARES P, MUNIZ MM. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005; 45(3):443-9.

ZANCOPE-OLIVEIRA RM, MUNIZ MM, WANKE B. Histoplasmoze. *In: COURA, J. R. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1208-21, 2005.

ZIMMERMANN CR, SNEDKER CJ, PAPPAGIANIS D. Characterization of *Coccidioides immitis* isolates by restriction fragment length polymorphisms. *J Clin Microbiol*. 1994; 32(12):3040-2.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Relação dos isolados de *C. posadasii* incluídos no estudo.

Código	Origem	Data	Local	Testes realizados
01-6-085	Lavado brônquico	2003	Ceará	TS, EO
01-6-087	Lavado brônquico	2002	Ceará	TS
01-6-088	Lavado brônquico	2003	Ceará	TS
01-6-089	Lavado brônquico	2001	Ceará	TS, EO
01-6-090	Solo (toca de tatu)	2004	Ceará	TS
01-6-091	Solo (toca de tatu)	2004	Ceará	TS, EE, EO
01-6-092	Solo (toca de tatu)	2004	Ceará	TS, EE, EO
01-6-101	Lavado brônquico	2004	Ceará	TS, EE, EO
01-6-102	Lavado brônquico	2004	Ceará	TS, EE, EO
01-6-103	Escarro	1995	Ceará	TS, EE, EO
05-2-063	Fluido pericárdico	2005	Ceará	TS, EO
05-2-064	Lavado brônquico	2006	Ceará	TS, EE, EO
05-2-065	Lavado brônquico	2006	Ceará	TS, EO
05-2-066	Lavado brônquico	2006	Ceará	TS, EE, EO
05-2-067	Lavado brônquico	2007	Ceará	TS, EE, EO
05-2-068	Lavado brônquico	2007	Ceará	TS, EE
05-2-069	Lavado brônquico	2006	Piauí	TS, EO
05-2-070	Escarro	2007	Ceará	TS, EE

TS: Teste de Sensibilidade; EE: Extração de Ergosterol; EO: Estresse Osmótico

APÊNDICE B – Relação dos isolados de *H. capsulatum* var. *capsulatum* incluídos no estudo.

Código	Origem	Data	Local	Testes realizados
03-2-090	Creme leucocitário	2007	Ceará	F
03-3-034	Creme leucocitário	2007	Ceará	F, B
03-3-055	Biópsia (mucosa nasal) - gato	2008	Ceará	F, L, B
03-4-036	Biópsia (duodeno)	2007	São Paulo	L
03-6-012	Creme Leucocitário	2010	Ceará	L
03-6-020	Aspirado medular	2008	Espírito Santo	L
03-6-024	Biópsia (palato)	2007	São Paulo	L
03-6-059	Biópsia (mucosa nasal) - gato	2008	Ceará	F, B
05-1-069	Creme leucocitário	2009	Ceará	L
05-1-070	Creme leucocitário	2009	Ceará	F
05-1-073	Creme leucocitário	2009	Ceará	F
05-1-075	Creme leucocitário	2009	Ceará	F, L
05-1-079	Creme leucocitário	2009	Ceará	L
05-1-097	Creme leucocitário	2009	Ceará	F
05-1-099	Creme leucocitário	2009	Ceará	F
05-2-020	Creme leucocitário	2009	Ceará	F
05-2-021	Creme leucocitário	2009	Ceará	F
05-2-034	Aspirado medular	2009	Ceará	L
05-2-035	Creme leucocitário	2009	Ceará	F
05-2-037	Creme leucocitário	2009	Ceará	F
05-2-038	Creme leucocitário	2009	Ceará	F
05-2-042	Creme leucocitário	2009	Ceará	F
05-2-053	Sangue	2009	Ceará	F, B
05-4-015	Biopsia	2007	São Paulo	F, L, B
05-5-011	Sangue	2011	Ceará	B

Teste de Sensibilidade sob a forma: F = Filamentosa; L= Leveduriforme; B = Biofilme.

APÊNDICE C – Valores de CIM e FICI para as drogas farnesol, itraconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B, isoladas e em combinação frente a cepas de *C. posadasii*.

FARNESOL (FOH) + ITRACONAZOL (ITR)					
CEPAS	CIM - Isolados		CIM - Combinação		FICI
	FOH (μM)	ITR ($\mu\text{g/mL}$)	FOH (μM)	ITR ($\mu\text{g/mL}$)	
01-6-085	0,0308	0,125	0,001925	0,007812	0,1249
01-6-087	0,0616	0,125	0,0154	0,03125	0,5
01-6-088	0,0616	0,125	0,0154	0,03125	0,5
01-6-089	0,0308	0,125	0,00385	0,015625	0,25
01-6-090	0,0308	0,25	0,0077	0,0625	0,5
01-6-091	0,0308	0,125	0,001925	0,007812	0,125
01-6-092	0,0154	0,125	0,0154	0,125	2
01-6-101	0,0154	0,125	0,0077	0,0625	1
01-6-102	0,0308	0,125	0,0077	0,03125	0,5
01-6-103	0,0077	0,5	0,00048	0,0312	0,12473
05-2-063	0,0616	0,125	0,0154	0,03125	0,5
05-2-064	0,0616	0,25	0,00385	0,0156	0,1249
05-2-065	0,0077	0,125	0,00385	0,0625	1
05-2-066	0,0308	0,25	0,001925	0,0156	0,1249
05-2-067	0,0308	0,125	0,0154	0,0625	1
05-2-068	0,0308	0,125	0,0154	0,0625	1
05-2-069	0,0308	0,125	0,0154	0,0625	1
05-2-070	0,0308	0,125	0,0077	0,03125	0,5
Média Geométrica	0,028516	0,151540	0,0061106	0,032468	0,42466

FARNESOL (FOH) + VORICONAZOL (VRZ)					
CEPAS	CIM – Isolados		CIM - Combinação		FICI
	FOH (μM)	VRZ ($\mu\text{g/mL}$)	FOH (μM)	VRZ($\mu\text{g/mL}$)	
01-6-085	0,0308	0,125	0,0077	0,03125	0,5
01-6-087	0,0616	0,125	0,0077	0,0156	0,2498
01-6-088	0,0616	0,125	0,0077	0,0156	0,2498
01-6-089	0,0308	0,125	0,0077	0,03125	0,5
01-6-090	0,0308	0,125	0,0077	0,03125	0,5
01-6-091	0,0308	0,125	0,0077	0,03125	0,5
01-6-092	0,0154	0,125	0,00385	0,03125	0,5
01-6-101	0,0154	0,125	0,0077	0,0625	1
01-6-102	0,0308	0,125	0,0077	0,03125	0,5
01-6-103	0,0077	0,125	0,00385	0,0625	1
05-2-063	0,0616	0,25	0,00385	0,0156	0,1249
05-2-064	0,0616	0,25	0,00385	0,0156	0,1249
05-2-065	0,0077	0,125	0,0077	0,125	2
05-2-066	0,0308	0,25	0,001925	0,0156	0,1249
05-2-067	0,0308	0,125	0,0077	0,03125	0,5
05-2-068	0,0308	0,125	0,0077	0,03125	0,5
05-2-069	0,0308	0,125	0,0077	0,03125	0,5
05-2-070	0,0308	0,125	0,0077	0,03125	0,5
Média Geométrica	0,0285169	0,1403078	0,0061115	0,0300561	0,424656

FARNESOL (FOH) + CASPOFUNGINA (CAS)

CEPAS	CIM – Isolados		CIM - Combinação		FICI
	FOH (μM)	CAS ($\mu\text{g/mL}$)	FOH (μM)	CAS ($\mu\text{g/mL}$)	
01-6-085	0,0308	32	0,001925	2	0,125
01-6-087	0,0616	16	0,0154	4	0,5
01-6-088	0,0616	16	0,0154	4	0,5
01-6-089	0,0308	32	0,001925	2	0,125
01-6-090	0,0308	32	0,001925	2	0,125
01-6-091	0,0308	16	0,001925	1	0,125
01-6-092	0,0154	16	0,0009625	1	0,125
01-6-101	0,0154	32	0,0009625	2	0,125
01-6-102	0,0308	16	0,0154	8	1
01-6-103	0,0077	32	0,001925	8	0,5
05-2-063	0,0616	32	0,00385	2	0,125
05-2-064	0,0616	32	0,00385	2	0,125
05-2-065	0,0077	32	0,0004812	2	0,125
05-2-066	0,0308	32	0,001925	2	0,125
05-2-067	0,0308	32	0,001925	2	0,125
05-2-068	0,0308	32	0,001925	2	0,125
05-2-069	0,0308	32	0,001925	2	0,125
05-2-070	0,0308	32	0,0077	8	0,5
Média Geométrica	0,02851	26,3955	0,00272	2,51984	0,18041

FARNESOL (FOH) + ANFOTERICINA B (AMB)

CEPAS	CIM – Isolados		CIM - Combinação		FICI
	FOH (μM)	AMB ($\mu\text{g/mL}$)	FOH (μM)	AMB ($\mu\text{g/mL}$)	
01-6-085	0,0308	0,125	0,0077	0,03125	0,5
01-6-087	0,0616	0,125	0,0077	0,015625	0,25
01-6-088	0,0616	0,125	0,0077	0,015625	0,25
01-6-089	0,0308	0,125	0,00385	0,015625	0,25
01-6-090	0,0308	0,125	0,00385	0,015625	0,25
01-6-091	0,0308	0,125	0,001925	0,0078125	0,125
01-6-092	0,0154	0,125	0,00385	0,03125	0,5
01-6-101	0,0154	0,0625	0,00385	0,015625	0,5
01-6-102	0,0308	0,125	0,00385	0,015625	0,25
01-6-103	0,0077	0,125	0,001925	0,03125	0,5
05-2-063	0,0616	0,125	0,0077	0,015625	0,25
05-2-064	0,0616	0,125	0,0077	0,015625	0,25
05-2-065	0,0077	0,125	0,001925	0,03125	0,5
05-2-066	0,0308	0,0625	0,0077	0,015625	0,5
05-2-067	0,0308	0,125	0,0077	0,03125	0,5
05-2-068	0,0308	0,125	0,00385	0,015625	0,25
05-2-069	0,0308	0,125	0,00385	0,015625	0,25
05-2-070	0,0308	0,0625	0,0154	0,03125	1
Média Geométrica	0,028516	0,111362	0,004850	0,01894259	0,340

APÊNDICE D – Quantificação de ergosterol de cepas de *C. posadasii* após exposição a diferentes concentrações de farnesol

Droga	CEPAS					
	05-2-064		05-2-066		05-2-067	
	Abs 295,10 nm	Ergosterol (μ M)	Abs 295,10 nm	Ergosterol (μ M)	Abs 295,10 nm	Ergosterol (μ M)
Farnesol (μ M)						
0,0156	0,036	12	0,018	6	0,014	4,666666667
0,0078	0,041	13,666666667	0,021	7	0,022	7,333333333
0,0039	0,04	13,333333333	0,026	8,666666667	0,025	8,333333333
0,0019	0,055	18,333333333	0,045	15	0,03	10
0,0009	0,072	24	0,075	25	0,042	14
0,00048	0,075	25	0,04	13,333333333	0,039	13
0,00024	0,055	18,333333333	0,039	13	0,039	13
0,00012	0,051	17	0,048	16	0,048	16
0,00006	0,059	19,666666667	0,052	17,333333333	0,055	18,333333333
Controle	0,075	25	0,104	34,666666667	0,058	19,333333333

Droga	CEPAS					
	05-2-068		05-2-070		01-6-091	
	Abs 295,10 nm	Ergosterol (μ M)	Abs 295,10 nm	Ergosterol (μ M)	Abs 295,10 nm	Ergosterol (μ M)
Farnesol (μ M)						
0,0156	0,038	12,666666667	0,024	8	0,017	5,666667
0,0078	0,044	14,666666667	0,032	10,66667	0,016	5,333333
0,0039	0,05	16,666666667	0,041	13,66667	0,017	5,666667
0,0019	0,037	12,333333333	0,07	23,33333	0,029	9,666667
0,0009	0,104	34,666666667	0,05	16,66667	0,043	14,33333
0,00048	0,09	30	0,055	18,33333	0,039	13
0,00024	0,07	23,333333333	0,047	15,66667	0,042	14
0,00012	0,054	18	0,052	17,33333	0,047	15,66667
0,00006	0,058	19,333333333	0,051	17	0,046	15,33333
Controle	0,109	36,333333333	0,06	20	0,05	16,66667

Droga	CEPAS					
	01-6-101		01-6-102		01-6-103	
	Abs 295,10 nm	Ergosterol (μM)	Abs 295,10 nm	Ergosterol (μM)	Abs 295,10 nm	Ergosterol (μM)
Farnesol (μM)						
0,0156	0,034	11,33333333	0,007	2,333333333	0,024	8
0,0078	0,038	12,66666667	0,009	3	0,058	19,33333
0,0039	0,052	17,33333333	0,01	3,333333333	0,075	25
0,0019	0,053	17,66666667	0,012	4	0,075	25
0,0009	0,039	13	0,013	4,333333333	0,057	19
0,00048	0,037	12,33333333	0,016	5,333333333	0,079	26,33333
0,00024	0,059	19,66666667	0,018	6	0,098	32,66667
0,00012	0,053	17,66666667	0,02	6,666666667	0,082	27,33333
0,00006	0,067	22,33333333	0,021	7	0,05	16,66667
Controle	0,069	23	0,02	6,666666667	0,078	26

Droga	CEPA	
	01-6-092	
	Farnesol (μM)	Ergosterol (μM)
	Abs 295,10 nm	
0,0156	0,041	13,66667
0,0078	0,043	14,33333
0,0039	0,04	13,33333
0,0019	0,047	15,66667
0,0009	0,03	10
0,00048	0,045	15
0,00024	0,03	10
0,00012	0,045	15
0,00006	0,03	10
Controle	0,052	17,33333

Droga	CEPA	
	01-6-103	
	ITR ($\mu\text{g/mL}$)	Ergosterol (μM)
Controle	Abs 295,10 nm	
0,125	0,009	3
0,0625	0,008	2,666667
0,03125	0,011	3,666667
0,015625	0,014	4,666667
0,0078125	0,016	5,333333
0,0039063	0,026	8,666667
0,0019531	0,022	7,333333
0,0009766	0,057	19
0,0004883	0,061	20,33333
Controle	0,067	22,33333

APÊNDICE E – Concentração Inibitória Mínima obtida para farnesol frente a cepas de *C. posadasii* na presença e ausência do estresse osmótico.

CEPAS	RPMI – NaCl CIM FOH (μM)	RPMI – Padrão CIM FOH (μM)
01-6-085	0,00195	0,0308
01-6-089	0,0078	0,0308
01-6-091	0,0078	0,0308
01-6-092	0,00049	0,0154
01-6-101	0,0078	0,0154
01-6-102	0,0078	0,0312
05-2-063	0,00049	0,0616
05-2-064	0,00195	0,0616
05-2-065	0,00195	0,0078
05-2-066	0,00195	0,0308
05-2-067	0,0078	0,0308
05-2-069	0,00195	0,0308
Controle ITR	0,00012	0,25
Controle AMB	0,0039	0,0125

APÊNDICE F – Valores de CIM e FICI para as drogas farnesol, itraconazol, e anfotericina B, isoladas e em combinação frente a cepas de *H. capsulatum*.

Fase Leveduriforme

CEPAS	FARNESOL CIM (μM)
05-1-069	0,0078
05-2-034	0,0312
05-1-079	0,0078
05-4-015	0,0312
03-6-024	0,0156
03-4-036	0,0312
03-3-055	0,0312
05-1-075	0,0078
03-6-020	0,0156
03-6-012	0,0156
Média Geométrica	0,016719666

Fase Filamentosa

CEPAS	FARNESOL (FOH) + ITRACONAZOL (ITR)				FICI
	CIM - Isolados		CIM - Combinação		
	FOH (μM)	ITR ($\mu\text{g/mL}$)	FOH (μM)	ITR ($\mu\text{g/mL}$)	
03-2-090	0,0078	0,0312	0,00048	0,0019	0,122435897
05-1-075	0,0156	0,0156	0,00024	0,000122	0,023205128
05-2-042	0,0156	0,00195	0,0039	0,00048	0,496153846
05-2-021	0,0156	0,0312	0,00024	0,00048	0,030769231
05-2-037	0,0078	0,0312	0,0039	0,0156	1
05-2-053	0,0156	0,0078	0,0039	0,00195	0,5
05-2-020	0,0156	0,0078	0,0078	0,0039	1
05-1-099	0,0156	0,00195	0,00048	0,00006	0,061538462
05-1-070	0,0156	0,0156	0,0039	0,0039	0,5
05-4-015	0,0156	0,0312	0,0039	0,0078	0,5
03-3-055	0,0078	0,0156	0,0019	0,0039	0,493589744
03-6-059	0,0156	0,0625	0,00097	0,0039	0,124579487
03-3-034	0,0156	0,0625	0,00195	0,0078	0,2498
05-2-038	0,0156	0,0156	0,0039	0,0039	0,5
05-1-097	0,0156	0,0156	0,0039	0,0039	0,5
05-2-035	0,0078	0,0312	0,00048	0,00195	0,124038462
05-1-073	0,0156	0,0312	0,0039	0,0078	0,5
05-2-070	0,0308	0,125	0,0077	0,03125	0,5
Média Geométrica	0,028516	0,151540	0,0061106	0,032468	0,42466

Fase Filamentosa

FARNESOL (FOH) + ANFOTERICINA B (AMB)					
CEPAS	CIM – Isolados		CIM - Combinação		FICI
	FOH (μM)	AMB ($\mu\text{g/mL}$)	FOH (μM)	AMB ($\mu\text{g/mL}$)	
03-2-090	0,0078	0,5	0,00048	0,0312	0,123938462
05-1-075	0,0156	0,0312	0,00097	0,00195	0,124679487
05-2-042	0,0156	0,0312	0,0078	0,0156	1
05-2-021	0,0156	0,0312	0,0078	0,0156	1
05-2-037	0,0078	0,125	0,0039	0,0625	1
05-2-053	0,0156	0,0312	0,0039	0,0078	0,5
05-2-020	0,0156	0,0312	0,0078	0,0156	1
05-1-099	0,0156	0,25	0,0078	0,125	1
05-1-070	0,0156	0,125	0,0078	0,0625	1
05-4-015	0,0156	0,0156	0,00195	0,00195	0,25
03-3-055	0,0078	0,25	0,00195	0,0625	0,5
03-6-059	0,0156	0,25	0,0078	0,125	1
03-3-034	0,0156	0,5	0,0078	0,25	1
05-2-038	0,0156	0,125	0,0039	0,0312	0,4996
05-1-097	0,0156	0,25	0,00195	0,0312	0,2498
05-2-035	0,0078	0,125	0,0039	0,0625	1
05-1-073	0,0156	0,0625	0,0039	0,0156	0,4996
05-2-070	0,0308	0,0625	0,0154	0,03125	1
Média Geométrica	0,028516	0,111362	0,004850	0,01894259	0,340

APÊNDICE G – Absorbância (590 nm) do biofilme de *H. capsulatum* exposto às drogas farnesol, itraconazol e anfotericina B, isoladas e em combinação.

FARNESOL – CIM								
Cepas	100X	50X	25X	12,5X	6,25X	3,125X	1,5X	Controle
03-3-055	0,113	0,12	0,121	0,126	0,127	0,157	0,159	0,182
	0,112	0,119	0,12	0,124	0,126	0,133	0,163	0,166
03-3-034	0,104	0,109	0,111	0,113	0,128	0,133	0,137	0,167
	0,099	0,106	0,109	0,112	0,128	0,133	0,133	0,143
05-2-053	0,101	0,104	0,112	0,113	0,12	0,124	0,13	0,146
	0,096	0,103	0,107	0,113	0,117	0,129	0,13	0,147
03-6-059	0,112	0,109	0,109	0,111	0,126	0,129	0,132	0,145
	0,096	0,104	0,108	0,11	0,116	0,129	0,131	0,139
05-4-015	0,28	0,285	0,302	0,36	0,386	0,422	0,489	0,571
	0,289	0,307	0,325	0,34	0,371	0,483	0,517	0,676
05-5-011	0,105	0,109	0,115	0,117	0,121	0,128	0,14	0,147
	0,101	0,107	0,108	0,117	0,118	0,123	0,138	0,143
ITRACONAZOL – CIM								
Cepas	100X	50X	25X	12,5X	6,25X	3,125X	1,5X	Controle
03-3-055	0,113	0,117	0,126	0,129	0,134	0,151	0,167	0,295
	0,113	0,117	0,119	0,127	0,132	0,136	0,164	0,183
03-3-034	0,117	0,121	0,126	0,129	0,136	0,139	0,147	0,152
	0,107	0,119	0,124	0,127	0,134	0,138	0,144	0,157
05-2-053	0,111	0,116	0,122	0,13	0,139	0,146	0,152	0,17
	0,096	0,114	0,122	0,128	0,137	0,139	0,147	0,155
03-6-059	0,105	0,111	0,113	0,113	0,12	0,122	0,129	0,159
	0,103	0,107	0,113	0,112	0,118	0,125	0,125	0,14
05-4-015	0,141	0,149	0,149	0,168	0,175	0,184	0,192	0,254
	0,118	0,145	0,146	0,152	0,175	0,182	0,186	0,242
05-5-011	0,126	0,136	0,147	0,152	0,162	0,173	0,174	0,242
	0,13	0,14	0,142	0,152	0,159	0,168	0,18	0,203
ANFOTERICINA B – CIM								
Cepas	100X	50X	25X	12,5X	6,25X	3,125X	1,5X	Controle
03-3-055	0,144	0,146	0,168	0,18	0,191	0,196	0,226	0,28
	0,136	0,146	0,148	0,185	0,188	0,204	0,213	0,242
03-3-034	0,113	0,116	0,136	0,139	0,14	0,147	0,156	0,208
	0,103	0,115	0,124	0,136	0,141	0,142	0,157	0,182
05-2-053	0,105	0,109	0,119	0,128	0,145	0,154	0,19	0,194
	0,101	0,108	0,118	0,127	0,135	0,147	0,167	0,33
03-6-059	0,127	0,134	0,136	0,146	0,158	0,169	0,229	0,232
	0,127	0,126	0,14	0,139	0,151	0,171	0,211	0,358
05-4-015	0,126	0,141	0,145	0,151	0,155	0,163	0,188	0,257
	0,128	0,129	0,142	0,152	0,153	0,156	0,174	0,217
05-5-011	0,107	0,114	0,123	0,133	0,137	0,153	0,161	0,17
	0,102	0,111	0,119	0,132	0,136	0,151	0,157	0,176

FARNESOL + ITRACONAZOL – CIM

Cepas	100X	50X	25X	12,5X	6,25X	3,125X	1,5X	Controle
03-3-055	0,102	0,12	0,163	0,175	0,195	0,306	0,354	0,548
	0,17	0,165	0,184	0,191	0,203	0,231	0,291	0,202
03-3-034	0,159	0,188	0,292	0,241	0,447	0,471	1,45	1,632
	0,12	0,115	0,15	0,126	0,208	0,225	0,206	0,389
05-2-053	0,129	0,134	0,163	0,16	0,188	0,246	0,333	0,239
	0,105	0,101	0,116	0,119	0,143	0,168	0,166	0,394
03-6-059	0,344	0,368	0,433	0,506	0,609	0,716	1,315	1,16
	0,139	0,207	0,211	0,363	0,309	0,377	1,081	0,961
05-4-015	0,273	0,347	0,481	0,542	0,621	0,911	1,024	1,069
	0,273	0,347	0,481	0,542	0,621	0,911	1,024	1,069

FARNESOL + ANFOTERICINA B – CIM

Cepas	100X	50X	25X	12,5X	6,25X	3,125X	1,5X	Controle
03-3-055	0,135	0,164	0,176	0,228	0,301	0,407	0,342	0,575
	0,11	0,158	0,245	0,278	0,257	0,219	0,313	0,379
03-3-034	0,156	0,132	0,115	0,157	0,157	0,182	0,221	0,284
	0,18	0,135	0,162	0,205	0,206	0,208	0,223	0,433
05-2-053	0,099	0,108	0,127	0,16	0,177	0,167	0,233	0,466
	0,108	0,141	0,151	0,161	0,164	0,187	0,248	0,442
03-6-059	0,103	0,184	0,169	0,235	0,396	0,486	0,645	0,618
	0,182	0,18	0,188	0,259	0,617	0,773	0,608	0,797
05-4-015	0,185	0,223	0,304	0,317	0,39	0,417	0,554	1,306
	0,185	0,223	0,304	0,317	0,39	0,417	0,554	1,306