



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

ERICA PACHECO CAETANO

**Efeito inibitório *in vitro* de ciprofloxacina isolada e em
combinação com antifúngicos frente a *Coccidioides posadasii*
e *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum***

Fortaleza - Ce

2010

Erica Pacheco Caetano

**Efeito inibitório *in vitro* de ciprofloxacina isolada e em
combinação com antifúngicos frente a *Coccidioides posadasii*
e *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum***

Dissertação 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 grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante

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

Fortaleza - Ce

2010

Erica Pacheco Caetano

Efeito inibitório *in vitro* de ciprofloxacina isolada e em combinação com antifúngicos frente a *Coccidioides posadasii* e *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*

Dissertação 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 grau de Mestre.

Data da Defesa: 10 / 12 / 2010

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira
Faculdade de Veterinária - Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Faculdade de Veterinária - Universidade Estadual do Ceará

Profa. Dra. Erika Freitas Mota
Centro de Ciências - Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante (orientadora)
Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará

*Aos meus pais, Marta Pacheco e Wagner Caetano,
e à minha irmã Jéssica Pacheco,*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, que iluminou o meu caminho e guiou os meus passos durante esta caminhada.

Aos meus amados pais, Marta Maria Ferreira Pacheco e Wagner dos Santos Caetano, e à minha irmã Jéssica Pacheco Caetano, que sempre foram meu alicerce! Obrigada por todo o amor, confiança e apoio nesta minha jornada, e por ajudarem a tornar-me uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu querido Carlos Henrique de Castro Freitas Soares, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades e acreditando na minha capacidade.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pelos conselhos, ensinamentos e pela oportunidade de trabalhar no Centro Especializado em Micologia Médica ao lado de pessoas de capacidade e caráter.

À Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, por toda a orientação concedida, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual. Obrigada pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela dedicação, paciência e, principalmente, por acreditar no meu potencial!

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pela co-orientação na composição deste trabalho e do artigo, pela competência e profissionalismo, sugestões e conhecimentos adquiridos.

À Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, pela orientação, apoio, incentivo e credibilidade, pelo esclarecimento de dúvidas e ensinamentos transmitidos.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem avaliar essa dissertação.

A todos os professores do Mestrado em Microbiologia Médica – UFC, pela dedicação e conhecimentos transmitidos, contribuindo para a minha formação.

Ao Prof. Dr. André Jalles Monteiro, pela análise estatística desta dissertação e do artigo.

Ao Médico Patologista da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Jacó Ricarte Lima Mesquita, pelo fornecimento de algumas cepas utilizadas nesta pesquisa.

A todos os meus colegas do Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM, em especial à Rita Amanda Chaves de Lima, Francisca Jakelyne de Farias Marques e Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia. Obrigada pelo auxílio durante os experimentos, a troca de conhecimentos, esclarecimento de dúvidas e por toda a força e apoio durante a resolução deste trabalho.

Aos meus colegas de mestrado, pela atenção e troca de idéias durante as disciplinas do curso, e pelo companheirismo e incentivo ao longo de todo este período.

A todos os funcionários da Universidade Federal do Ceará, em especial ao Daniel Teixeira Lima, Monalisa da Cunha Costa, Eliane Nascimento Nunes e Terezinha de Jesus Santos Rodrigues, pela disponibilidade, simpatia e auxílio na realização de tarefas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

Chico Xavier

RESUMO

A coccidioidomicose e a histoplasmose são micoses sistêmicas que acometem o homem e animais, causadas por espécies de fungos dimórficos, com ênfase para *Coccidioides posadasii* e *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, respectivamente. São consideradas doenças profundas importantes, podendo culminar em diversas complicações secundárias. Nos últimos anos, a melhoria dos métodos de diagnóstico micológico e o aumento da ocorrência de doenças imunossupressoras causaram grande impacto na incidência das micoses profundas e oportunistas no mundo. Apesar da existência de terapias eficazes com antifúngicos contra a coccidioidomicose e a histoplasmose, a busca por novas drogas para o tratamento destas doenças se faz necessária. Ciprofloxacina é uma droga antibacteriana clássica do grupo das fluoroquinolonas, que inibe a atividade catalítica da DNA girase e topoisomerase IV, essenciais na replicação e transcrição do DNA bacteriano. Estudos verificaram que ciprofloxacina pode atuar na DNA girase dos fungos. Assim, o presente estudo visou avaliar o efeito inibitório *in vitro* de ciprofloxacina (CIP) isolada e em combinação com os antifúngicos anfotericina B (AMB), itraconazol (ITC), voriconazol (VRC) e caspofungina (CAS) frente à *C. posadasii* e *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Foram utilizados 16 cepas de *C. posadasii* na fase filamentosa, 16 cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* na fase filamentosa e 9 cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* na fase leveduriforme. O estudo foi conduzido em ensaio de macrodiluição e microdiluição em caldo, descritos nos documentos M-38A e M-27A2, padronizados pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), sendo utilizados para *C. posadasii* e *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, respectivamente. A interação das drogas foi analisada através do cálculo do Índice da Concentração Inibitória Fracionária (FICI), definido como a soma das relações entre a concentração inibitória mínima (CIM) de cada droga em combinação e a CIM da mesma droga isolada, considerando os valores menores ou iguais a 0,5 indicativos de sinergismo. Com relação às cepas de *C. posadasii*, foram observadas interações sinérgicas em todas as combinações, com destaque para as associações de CIP ($3,125 \leq \text{CIM} \leq 12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) com ITC ($0,0078 \leq \text{CIM} \leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$) (n=13/16), CIP ($3,125 \leq \text{CIM} \leq 12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) com VRC ($0,0078 \leq \text{CIM} \leq 0,0312 \mu\text{g mL}^{-1}$) (n=13/16) e CIP ($3,125 \leq \text{CIM} \leq 12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) com CAS ($2 \leq \text{CIM} \leq 8 \mu\text{g mL}^{-1}$) (n=14/16). Para as cepas de *H. capsulatum* na fase filamentosa, também foram observadas interações sinérgicas em todas as combinações, com destaque para as associações de CIP ($3,906 \leq \text{CIM} \leq 62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) com ITC ($0,00006 \leq \text{CIM} \leq 0,0078 \mu\text{g mL}^{-1}$) (n=14/16) e CIP ($31,25 \leq \text{CIM} \leq 125 \mu\text{g mL}^{-1}$) com VRC ($0,0156 \leq \text{CIM} \leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$) (n=16/16). No tocante às cepas de *H. capsulatum* na fase leveduriforme, foram observadas poucas interações sinérgicas nas combinações de drogas testadas. Nenhuma das associações de drogas testadas apresentou antagonismo. Os dados obtidos apontam uma nova alternativa para o tratamento da coccidioidomicose e da histoplasmose, sendo necessários novos estudos que visem investigar os mecanismos de ação dessas combinações de drogas no metabolismo celular fúngico, bem como o delineamento de experimentos *in vivo* para confirmar a significância desses achados.

Palavras-chave: Testes de Sensibilidade Antimicrobiana, Antifúngicos, Fluoroquinolona, *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum*.

ABSTRACT

Coccidioidomycosis and histoplasmosis are systemic mycoses that occur in humans and other animals and are caused by the dimorphic fungi *Coccidioides posadasii* and *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, respectively. They are considered important deep mycoses that can lead to several secondary complications. In the past years, the improvement of the techniques applied in mycological diagnosis and the increase in the occurrence of immunocompromising diseases have caused a great impact in the incidence of deep and opportunistic mycoses in the world. In spite of the existence of effective antifungal therapy against coccidioidomycosis and histoplasmosis, the pursue of new drugs to treat these diseases is necessary. Ciprofloxacin is a classic antibacterial drug that belongs to the group of fluoroquinolones, which inhibit the catalytic activity of DNA gyrase and topoisomerase IV, which are essential in bacterial DNA replication and transcription. Some studies have shown that ciprofloxacin can act on fungal DNA gyrase. Thus, the present study aimed at evaluating the *in vitro* inhibitory effect of ciprofloxacin (CIP), when associated with amphotericin B (AMB), itraconazole (ITC), voriconazole (VRC) or caspofungina (CAS), on *C. posadasii* and *H. capsulatum* var. *capsulatum*. Sixteen strains of *C. posadasii* in the filamentous phase and 16 and 9 strains of *H. capsulatum* in the filamentous and yeast-like phase, respectively, were used. Broth macrodilution and microdilution assays were performed, as described in the documents M38-A and M27-A2, respectively, of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Drug interaction was analyzed by calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI), which is defined as the sum of the ratios between the minimal inhibitory concentration (MIC) of each combined drug and the MIC of the same drug isolatedly. Values of FICI smaller or equal to 0.5 indicate the occurrence of synergy. Concerning the isolates of *C. posadasii*, synergistic interactions were observed for all combinations, especially for the associations of CIP ($3.125 \leq \text{CIM} \leq 12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) with ITC ($0.0078 \leq \text{CIM} \leq 0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$) (n=13/16), CIP ($3.125 \leq \text{CIM} \leq 12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) with VRC ($0.0078 \leq \text{CIM} \leq 0.0312 \mu\text{g mL}^{-1}$) (n=13/16) and CIP ($3.125 \leq \text{CIM} \leq 12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) with CAS ($2 \leq \text{CIM} \leq 8 \mu\text{g mL}^{-1}$) (n=14/16). For the isolates of *H. capsulatum* in the filamentous phase synergistic interactions were also observed for all combinations, with emphasis to the associations of CIP ($3.906 \leq \text{CIM} \leq 62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) with ITC ($0.00006 \leq \text{CIM} \leq 0.0078 \mu\text{g mL}^{-1}$) (n=14/16) and CIP ($31.25 \leq \text{CIM} \leq 125 \mu\text{g mL}^{-1}$) with VRC ($0.0156 \leq \text{CIM} \leq 0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$) (n=16/16). For *H. capsulatum* in yeast-like phase, few synergistic interactions were observed for the tested drug combinations. None of the tested combinations presented antagonism. The obtained data may point at a new alternative for the treatment of coccidioidomycosis and histoplasmosis. Thus, it is necessary to investigate the mechanisms of action of these drug combinations on the fungal cellular metabolism and to perform *in vivo* experiments to confirm the relevance of these findings.

Keywords: Antimicrobial susceptibility tests, Antifungals, Fluoroquinolone, *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum*.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Coccidioidomicose.....	19
1.1.1	Aspectos históricos.....	19
1.1.2	O gênero <i>Coccidioides</i>	20
1.1.3	Epidemiologia.....	23
1.1.4	Patogenia, aspectos clínicos e imunológicos.....	24
1.1.5	Diagnóstico.....	27
1.1.6	Tratamento.....	29
1.2	Histoplasmose.....	31
1.2.1	Aspectos históricos.....	31
1.2.2	O gênero <i>Histoplasma</i>	32
1.2.3	Epidemiologia.....	34
1.2.4	Patogenia, aspectos clínicos e imunológicos.....	35
1.2.5	Diagnóstico.....	37
1.2.6	Tratamento.....	39
1.3	Drogas antifúngicas.....	40
1.3.1	Anfotericina B.....	40
1.3.2	Derivados azólicos.....	42
1.3.3	Equinocandinas.....	44
1.4	Drogas antimicrobianas com potencial antifúngico.....	46
1.5	Métodos de estudo da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	49
2	PERGUNTAS DE PARTIDA	53
3	HIPÓTESES CIENTÍFICAS	53
4	OBJETIVOS	54
4.1	Objetivo geral.....	54
4.2	Objetivos específicos.....	54
5	MATERIAIS E MÉTODOS	55
5.1	Microrganismos.....	56
5.2	Agentes antimicrobianos.....	61
5.3	Preparo do inóculo para teste de sensibilidade.....	61
5.4	Ensaio de macrodiluição e microdiluição <i>in vitro</i>	62
5.5	Ensaio de combinação de drogas <i>in vitro</i>	64

5.6	Teste de ciprofloxacina em baixa concentração associada à anfotericina B.....	66
5.7	Análise Estatística.....	66
6	RESULTADOS	67
6.1	Teste de sensibilidade de drogas isoladas.....	67
6.2	Teste de sensibilidade de drogas em combinação.....	69
6.3	Teste de ciprofloxacina em baixa concentração associada à anfotericina B.....	74
7	DISCUSSÃO	76
8	CONCLUSÕES	85
	BIBLIOGRAFIA	86
	APÊNDICE	102
	ANEXO I	107
	ANEXO II	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição geográfica das cepas de <i>C. immitis</i> e <i>C. posadasii</i> no Continente Americano.....	21
Figura 2	Aspecto morfológico de <i>Coccidioides</i> spp. na fase filamentosa. A. Macromorfologia em ágar Batata; B. Micromorfologia, mostrando artroconídios e células disjuntoras.....	22
Figura 3	Aspecto morfológico de <i>Coccidioides</i> spp. na fase leveduriforme. A. Esférulas apresentando diferentes estágios de maturação; B. Esférula madura com numerosos endósporos.....	23
Figura 4	Ciclo biológico de <i>Coccidioides</i> spp., demonstrando a fase saprofítica no ambiente (1) e a fase parasitária após a inalação de artroconídios por um hospedeiro susceptível (3).....	25
Figura 5	Aspecto morfológico de <i>H. capsulatum</i> na fase filamentosa. A. Macromorfologia em ágar batata; B. Micromorfologia, mostrando hifas septadas e macroconídios tuberculados.....	33
Figura 6	Aspecto morfológico de <i>H. capsulatum</i> na fase leveduriforme. A. Macromorfologia em ágar BHI com sangue de carneiro 10%; B. Micromorfologia, mostrando células ovais uninucleadas.....	33
Figura 7	Ciclo biológico de <i>H. capsulatum</i> , demonstrando a fase saprofítica no ambiente e a fase parasitária após a inalação de conídios por um hospedeiro susceptível.....	36
Figura 8	Mecanismo de ação da Anfotericina B.....	41
Figura 9	Mecanismo de ação dos derivados azólicos.....	43
Figura 10	Mecanismo de ação das equinocandinas.....	45
Figura 11	Mecanismo de ação das quinolonas. As duas subunidades A da DNA girase ao clivarem a dupla fita de DNA bacteriano permitem que moléculas de quinolonas interajam com ambas, havendo a quebra da fita de DNA, o que acarreta a não replicação e compactação do DNA e conseqüente morte celular.....	48
Figura 12	Estrutura química da ciprofloxacina.....	48
Figura 13	A. Sala de nível de biossegurança 3 (NB-3); B. Cabine de segurança biológica classe II.....	55

Figura 14	<i>Coccidioides posadasii</i> na fase filamentosa. A. Macromorfologia, mostrando colônias algodonosas brancas; B. Micromorfologia, mostrando hifas e artroconídios intercalados por células disjuntoras.....	56
Figura 15	<i>Histoplasma capsulatum</i> na fase filamentosa. A. Macromorfologia, mostrando colônias algodonosas brancas; B. Micromorfologia, mostrando hifas e macroconídios tuberculados.....	57
Figura 16	<i>Histoplasma capsulatum</i> na fase leveduriforme. A. Macromorfologia, mostrando colônias cremosas, úmidas e lisas; B. Micromorfologia, mostrando células ovais uninucleadas.....	57
Figura 17	Exame direto de escarro em preparação com KOH 30%, mostrando uma esférula de <i>C. posadasii</i> repleta de endósporos.....	58
Figura 18	Leucócitos corados com Giemsa, mostrando células leveduriformes intracelulares de <i>H. capsulatum</i>	58
Figura 19	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de anfotericina B frente a cepas de <i>C. posadasii</i>	64
Figura 20	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da associação de ciprofloxacina com itraconazol frente a cepas de <i>C. posadasii</i>	65
Figura 21	Índice da concentração inibitória fracionária (FICI) da droga ciprofloxacina em combinação com os antifúngicos frente às 16 cepas de <i>C. posadasii</i>	71
Figura 22	Concentração inibitória mínima (CIM) da droga ciprofloxacina em combinação com os antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e caspofungina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) frente às 16 cepas de <i>C. posadasii</i>	71
Figura 23	Índice da concentração inibitória fracionária (FICI) da droga ciprofloxacina em combinação com os antifúngicos frente às 16 cepas de <i>H. capsulatum</i> (fase filamentosa).....	72
Figura 24	Concentração inibitória mínima (CIM) da droga ciprofloxacina em combinação com os antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e caspofungina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) frente às 16 cepas de <i>H. capsulatum</i> (fase filamentosa).....	72
Figura 25	Índice da concentração inibitória fracionária (FICI) da droga ciprofloxacina em combinação com os antifúngicos frente às 16 cepas de <i>H. capsulatum</i> (fase leveduriforme).....	73

Figura 26	Concentração inibitória mínima (CIM) da droga ciprofloxacina em combinação com os antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e caspofungina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) frente às 16 cepas de <i>H. capsulatum</i> (fase leveduriforme).....	73
Figura 27	Índice da concentração inibitória fracionária (FICI) da combinação de ciprofloxacina em baixa concentração [\downarrow] com anfotericina B comparada à associação de ciprofloxacina em elevada concentração com anfotericina B frente às 16 cepas de <i>C. posadasii</i>	74
Figura 28	Índice da concentração inibitória fracionária (FICI) da combinação de ciprofloxacina em baixa concentração [\downarrow] com anfotericina B comparada à associação de ciprofloxacina em elevada concentração com anfotericina B frente às 16 cepas de <i>H. capsulatum</i> (fase filamentosa).....	75
Figura 29	Concentração inibitória mínima (CIM) da combinação de ciprofloxacina em baixa concentração [\downarrow] com anfotericina B ($\mu\text{g mL}^{-1}$) frente às 16 cepas de <i>C. posadasii</i> e às 16 cepas de <i>H. capsulatum</i> (fase filamentosa).....	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Relação dos isolados clínicos e ambientais de <i>Coccidioides posadasii</i> utilizados na pesquisa.....	59
Quadro 2	Relação dos isolados clínicos de <i>Histoplasma capsulatum</i> utilizados na pesquisa.....	60
Quadro 3	Intervalos das concentrações de ciprofloxacina e das drogas antifúngicas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) testadas isoladamente frente a cepas de <i>C. posadasii</i> e <i>H. capsulatum</i> (de ambas as fases).....	63
Quadro 4	Intervalos das concentrações de ciprofloxacina e das drogas antifúngicas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) testadas em combinação frente a cepas de <i>C. posadasii</i> e <i>H. capsulatum</i> (de ambas as fases).....	65
Quadro 5	Determinação do FICI e parâmetros para análise dos dados.....	65
Quadro 6	Intervalos das concentrações reduzidas de ciprofloxacina e concentrações de anfotericina B ($\mu\text{g mL}^{-1}$) testadas em combinação frente a cepas de <i>C. posadasii</i> e <i>H. capsulatum</i> (fase filamentosa).....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração inibitória mínima (CIM) de ciprofloxacina e das drogas antifúngicas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) testadas isoladamente frente a cepas de <i>C. posadasii</i> e <i>H. capsulatum</i> (de ambas as fases).....	68
Tabela 2	Controle de qualidade de ciprofloxacina e das drogas antifúngicas.....	68
Tabela 3	Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e anfotericina B isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de <i>C. posadasii</i>	108
Tabela 4	Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e itraconazol isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de <i>C. posadasii</i>	109
Tabela 5	Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e voriconazol isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de <i>C. posadasii</i>	110
Tabela 6	Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e caspofungina isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de <i>C. posadasii</i>	111
Tabela 7	Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e anfotericina B isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de <i>H. capsulatum</i> (fase filamentosa).....	112
Tabela 8	Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e itraconazol isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de <i>H. capsulatum</i> (fase filamentosa).....	113
Tabela 9	Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e voriconazol isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de <i>H. capsulatum</i> (fase filamentosa).....	114
Tabela 10	Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e caspofungina isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de <i>H. capsulatum</i> (fase filamentosa).....	115
Tabela 11	Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e anfotericina B isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de <i>H. capsulatum</i> (fase leveduriforme).....	116

Tabela 12	Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e itraconazol isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de <i>H. capsulatum</i> (fase leveduriforme).....	117
Tabela 13	Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e voriconazol isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de <i>H. capsulatum</i> (fase leveduriforme).....	118
Tabela 14	Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e caspofungina isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de <i>H. capsulatum</i> (fase leveduriforme).....	119
Tabela 15	Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) da combinação de ciprofloxacina em baixa concentração e anfotericina B e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de <i>C. posadasii</i>	120
Tabela 16	Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) da combinação de ciprofloxacina em baixa concentração e anfotericina B e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de <i>H. capsulatum</i> (fase filamentosa).....	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFST-EUCAST	<i>Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility</i>
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMB	Anfotericina B
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CAS	Casposfungina
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
E-test	<i>Epsilometer Strip Test</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIC	Concentração Inibitória Fracionada
FICI	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
HE	Hematoxilina-Eosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
ITC	Itraconazol
K ⁺	Potássio
Mep1	Metaloproteinase 1
MG	Média geométrica
μ g	microgramas
mL	mililitros
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
NB-3	Nível de biossegurança 3
PAS	Ácido periódico de Shiff

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PO_4^{3-}	Fosfato
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VRC	Voriconazol

1 INTRODUÇÃO

1.1 Coccidioidomicose

1.1.1 Aspectos Históricos

O primeiro caso da coccidioidomicose foi descrito em 1892, pelo estudante de medicina Alejandro Posadas, na cidade de Buenos Aires, Argentina. O paciente Domingo Escurra, de 32 anos de idade, apresentava lesões crônicas na pele e nos linfonodos, diagnosticadas inicialmente como micose fungóide (caracterizada por tumorações na pele). A partir de material clínico extraído das lesões, o estudante detectou um microrganismo que acreditava tratar-se de um protozoário (POSADAS, 1892; RESTREPO, 2006).

Em 1894, Rixford e Gilchrist descreveram casos da doença na Califórnia, EUA, onde evidenciaram a presença de um microrganismo semelhante ao descrito por Posadas, apresentando células arredondadas, de paredes grossas e de tamanho variado, que foram denominadas de esférulas e o conteúdo interno de endósporos. Posteriormente eles relacionaram a estrutura do mesmo aos protozoários da classe Sporozoa, gênero *Coccidia*, denominando-o de *Coccidioides immitis* (do latim: *Coccidioides*=*coccidium*; *immitis*=não leve) (ODDS, 2003a; RESTREPO, 2006).

Somente em 1905, William Ophus e Herbert Moffit descobriram a natureza fúngica do agente etiológico da coccidioidomicose ao observarem que o cultivo de material de autópsia de um caso fatal da doença apresentava formação de micélio fúngico em meios de cultivo. Eles verificaram que as diferentes apresentações morfológicas do microrganismo em determinadas condições de cultivo pertenciam a um mesmo ciclo de vida, caracterizando o dimorfismo do patógeno (COX; MAGEE, 2004; PAIXÃO; ROCHA; SIDRIM, 2004).

Em 1927, Hirchs e Benson realizaram os primeiros estudos imunológicos da doença através de testes de reação cutânea utilizando-se extratos obtidos da fase filamentosa do fungo. Dois anos mais tarde, Ophus definiu a via respiratória como principal forma de aquisição da infecção, inicialmente afetando os pulmões e posteriormente sujeito a disseminação (PAIXÃO; ROCHA; SIDRIM, 2004).

Em 1938, Dickson e Gifford introduziram o termo “coccidioidomicose”, definindo como sinonímia às doenças conhecidas como “febre do vale de San Joaquin”, “enfermidade da Califórnia” e “febre do deserto” (ELIAS-COSTA; NEGRONI; GIMENO, 1985). Em meados da década de 40, foram relatados casos da doença também em animais domésticos e silvestres, principalmente em cães (SMITH et al., 1948).

O primeiro caso da doença no Brasil foi descrito em 1978, por Gomes et al., em paciente proveniente de Pirapiranga, Estado da Bahia. O diagnóstico foi consolidado através de estudos histopatológicos de tecido pulmonar (GOMES et al., 1978). No ano seguinte, foi relatado um caso proveniente do Piauí por Vianna; Passos; Sant'ana (1979), sendo o diagnóstico também firmado por análise histológica.

Wanke et al. (1999) relataram a primeira microepidemia de coccidioidomicose no Brasil ocorrida em 1991, também no Estado do Piauí, no município de Oeiras, envolvendo três caçadores de tatus e oito cães com quadro respiratório agudo. Amostras de solo do local onde foi praticada a caça aos tatus confirmaram o fato através do isolamento de *C. posadasii*. (WANKE et al., 1999). Do mesmo modo, Sidrim et al. (1997) e Silva et al. (1997) relataram uma microepidemia ocorrida em 1995 no município de Aiuaba, interior do Estado do Ceará. Cerca de quatro casos foram relatados, envolvendo caçadores de tatu (SIDRIM et al., 1997; SILVA et al., 1997).

Posteriormente, foram descritos novos casos da doença no Estado do Ceará. Em 1999, foi registrado um caso de coccidioidomicose pulmonar em caçador de tatu no município de Independência, cujo microrganismo foi identificado através de pesquisa direta, cultura de escarro e inoculação em modelo murino (SILVA et al., 1999). Em 2001, foi registrado um caso de mesma natureza em Boa Viagem (COSTA et al., 2001), e outro caso de um paciente com lesões cutâneas no município de Solonópoles. No período de 2002 a 2005, foram relatados seis novos casos da doença procedentes de diferentes municípios do Ceará, como Catunda, Santa Quitéria, Solonópoles, Arneiroz e Ibiapina (CORDEIRO et al., 2010). Em 2006, foram revelados na cidade de Sobral mais três casos de coccidioidomicose, sendo confirmados por exame direto, cultura, imunodifusão e PCR (TOGASHI et al., 2009), e um ano depois, mais três novos casos surgiram nas cidades de Jaguaribe e Parambu (CORDEIRO et al., 2010).

1.1.2 O gênero *Coccidioides*

A coccidioidomicose possui como agentes etiológicos os fungos dimórficos térmicos do gênero *Coccidioides*. Por mais de um século, acreditou-se que a espécie *C. immitis* fosse a única representante do gênero. No entanto, Fisher et al. (2002) descreveram uma nova espécie denominada *C. posadasii*, baseados nas análises moleculares com marcadores do tipo microssatélites, capazes de diferenciar estas duas espécies com exatidão.

Devido a estas duas espécies serem indistinguíveis com relação à morfologia e às manifestações clínicas da doença (CATANZARO, 2004), estratégias laboratoriais foram

utilizadas para permitir a diferenciação das mesmas, como a análise de polimorfismos de microssatélites (FISHER et al., 2002) e a reação de PCR (UMEYAMA et al., 2006). Além disso, algumas diferenças fisiológicas também foram observadas, contribuindo para a distinção das duas espécies, como a capacidade de *C. immitis* crescer mais rapidamente em meio com alta concentração de salinidade, quando comparado a *C. posadasii* (FISHER et al., 2002), e a capacidade de *C. posadasii* crescer mais rapidamente a 37°C, *in vitro*, quando comparado a *C. immitis* (BARKER et al., 2006).

Os aspectos epidemiológicos também conferem um auxílio à distinção de ambas as espécies: *C. immitis* encontra-se restrito ao Vale de San Joaquin, na Califórnia, Estados Unidos da América, sendo conhecido como linhagem “californiana”, enquanto que *C. posadasii*, descrito anteriormente como linhagem “não-californiana” de *C. immitis*, apresenta uma distribuição mais ampla, abrangendo outros locais dos Estados Unidos da América e outros países como México, Honduras, Venezuela, Argentina, Guatemala, Paraguai e Brasil (Figura 1) (FISHER et al., 2001, 2002; LANIADO-LABORÍN, 2007).

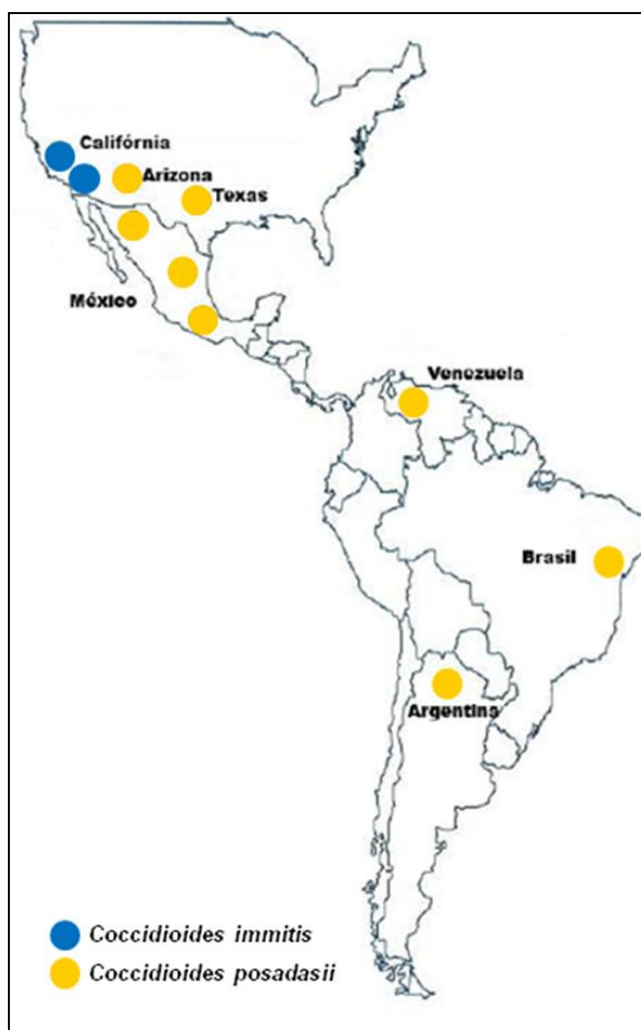


Figura 1. Distribuição geográfica das cepas de *C. immitis* e *C. posadasii* no Continente Americano. Fonte: Adaptação de FISHER et al., 2001.

No entanto, mesmo com a caracterização geográfica bem definida das duas espécies, alguns casos da doença causada por *C. immitis* foram descritos em áreas não endêmicas, devido provavelmente aos frequentes movimentos transregional e transnacional da população (CASTAÑÓN-OLIVARES et al., 2007; JEWELL; CHESHER; CAGE, 2008; LAN et al., 2010).

Taxonomicamente, o gênero *Coccidioides* enquadra-se na Família Onygenacea, Ordem Onygenales, Classe Euscomycetes, Filo Ascomycota (FISHER et al., 2002). O gênero *Coccidioides* pode apresentar-se em duas fases, saprofítica e parasitária. Em condição saprofítica, encontram-se sob a forma filamentosa no solo à temperatura de 25-30°C, sendo esta a forma infectante do ciclo biológico desse fungo, o qual apresenta micélio formado por hifas finas, hialinas e septadas, que originam artroconídios, estruturas que medem de 2-4µm por 3-6 µm, intercalados por células desprovidas de material citoplasmático, denominadas disjuntoras (Figura 2) (WALSH et al., 2003; COX; MAGEE, 2004). Os artroconídios apresentam em suas extremidades restos de parede celular de células disjuntoras, responsáveis por sua fácil veiculação aérea (RESTREPO, 2006).

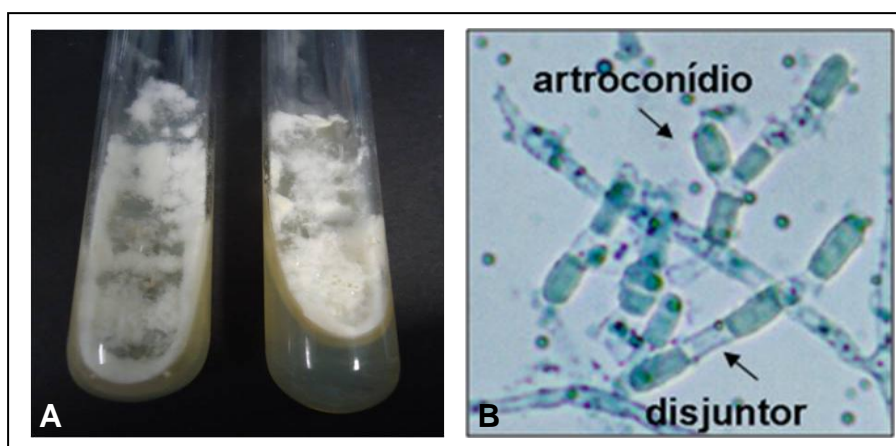


Figura 2. Aspecto morfológico de *Coccidioides* spp. na fase filamentosa. **A.** Macromorfologia em Agar Batata; **B.** Micromorfologia, mostrando artroconídios e células disjuntoras. Fonte: CEMM, 2008.

Já na fase parasitária, nos tecidos do hospedeiro à temperatura de 37°C, os artroconídios sofrem mudanças morfológicas, adquirindo a fase leveduriforme do ciclo biológico do fungo, caracterizada pela formação de grandes estruturas arredondadas de paredes espessas denominadas esférulas, que medem 20 a 200 µm de diâmetro, as quais sofrem divisões internas que dão origem a centenas de endósporos de 2 a 5 µm de diâmetro (Figura 3) (SAUBOLLE, 2007).

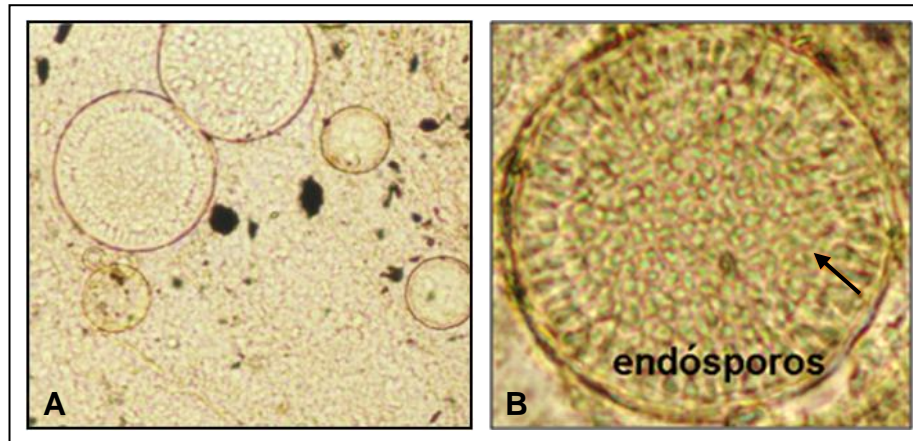


Figura 3. Aspecto morfológico de *Coccidioides* spp. na fase leveduriforme. **A.** Esférulas apresentando diferentes estágios de maturação; **B.** Esférula madura com numerosos endósporos. Fonte: CEMM, 2008.

Coccidioides spp. são fungos geofílicos, que habitam em ambientes semi-áridos e desérticos, de vegetação xerófitas, com temperatura média acima de 30°C, em solos com pH alcalino e elevada salinidade, ocorrendo a uma profundidade de 5 a 30 cm da superfície do solo (PAIXÃO; ROCHA; SIDRIM, 2004). A maioria dos casos da doença está relacionado ao hábito de escavar tocas de tatus das espécies *Dasyurus novemcinctus* (COSTA et al., 2001; EULÁLIO et al., 2001). Devido *Coccidioides* spp. não se mostrarem bem adaptados para competições com outros microrganismos, sua sobrevivência é diminuída quando outras espécies de fungos ou bactérias estão presentes no solo (SAUBOLLE; MCKELLAR; SUSSLAND, 2007).

1.1.3 Epidemiologia

O sudoeste dos Estados Unidos é considerado a região com maior incidência de casos de coccidioidomicose, apresentando várias zonas endêmicas, como Nevada, Colorado, Arizona, Sudoeste da Califórnia, Oeste do Texas e partes de Utah (DIXON, 2001). Outros países como México, Honduras, Guatemala, Colômbia, Venezuela, Bolívia, Paraguai e Argentina também são considerados áreas endêmicas (CASTAÑÓN-OLIVARES et al., 2004; LANIADO-LABORÍN, 2007; BAPTISTA-ROSAS; HINOJOSA; RIQUELME, 2007).

Somente em 1998, o Brasil foi incluído na relação de países com áreas endêmicas da doença, em locais situados na zona semi-árida da região Nordeste que abrangem os Estados do Maranhão, Piauí, Bahia e Ceará (WANKE et al., 1999; EULÁLIO et al., 2001; CORDEIRO et al., 2010). No Ceará, foram descritos 19 casos da doença em pacientes procedentes dos Municípios de Aiuaba, Independência, Boa Viagem, Solonópoles, Catunda,

Santa Quitéria, Arneiroz, Ibiapina, Sobral, Jaguaribe e Parambu (FECHINE, 2005; TOGASHI et al., 2009; CORDEIRO et al., 2010).

O Estado do Ceará possui diversos casos de coccidioomicose relacionados à caçadas de tatu, animal bastante apreciado como alimento na região. Os caçadores, ao escavarem o solo a procura do animal, ficam expostos à forma infectante do fungo através da inalação dos artroconídios da fase saprofítica (PEREIRA JUNIOR; JORGE; BAGAGLI, 2003; CORDEIRO et al., 2006a). As tocas de outros animais também podem estar relacionadas com a epidemiologia da doença, sendo verificado em alguns casos associados ao contato com buracos de roedores nos Estados Unidos (DRUTZ; CATANZARO, 1978).

Assim, atividades como caçadas de tatu, trabalho agrícola e escavações arqueológicas, por exemplo, podem estar relacionadas com o desenvolvimento da coccidioomicose, por serem práticas que envolvem o revolvimento do solo (VERAS et al., 2003; PAIXÃO; ROCHA; SIDRIM, 2004). Fenômenos naturais como furacões, terremotos e fortes ventanias, também podem estar associados ao acontecimento de casos da doença (RESTREPO, 2006).

1.1.4 Patogenia, aspectos clínicos e imunológicos

A porta de entrada da coccidioomicose no organismo é o trato respiratório, através da inalação dos artroconídios (GALGIANI et al., 2005). No solo, os artroconídios são liberados após autólise das células disjuntoras, se dispersando facilmente no ar, podendo germinar e reiniciar o ciclo sapróbio ou serem inalados por um hospedeiro suscetível e dar início ao ciclo parasitário (Figura 4) (HUNG; XUE; COLE, 2007).

Quando os artroconídios são inalados, estes se alojam nos alvéolos pulmonares e passam por modificações morfológicas, transformando-se em esférulas, que também sofrem mudanças em sua estrutura para formar cerca de 200 a 300 endósporos em seu interior. Quando as esférulas atingem a maturação, estas sofrem ruptura e liberam os endósporos, os quais atuam como novo agente infectante, capazes de crescer e diferenciar-se em novas esférulas, que darão origem novamente a inúmeros endósporos, reiniciando o ciclo parasitário (Figura 4) (LANIADO-LABORÍN, 2006; RESTREPO, 2006).

Os artroconídios alojados nos alvéolos pulmonares estimulam uma resposta inicial do hospedeiro caracterizada por um influxo de leucócitos polimorfonucleares, que produzem substâncias quimiotáticas em resposta a ativação do sistema complemento. Estas substâncias desencadeiam o processo inflamatório, gerando aumento na resposta frente ao microrganismo (MOROYOQUI; FIGUEROA, 2008). Após a conversão dos artroconídios para esférula, nova

resposta ocorre com uma infiltração de células mononucleares, que se mantém durante todo o processo inflamatório, causando a formação de granulomas (CHILLER; GALGIANI; STEVENS, 2003). Substâncias liberadas a partir da ruptura das esférulas, durante a liberação dos endósporos, acabam provocando uma resposta transitória dos leucócitos polimorfonucleares (DICAUDO, 2006). O tamanho das esférulas maduras impede a sua ingestão por células fagocíticas. Já os endósporos recém-liberados, por serem menores, são susceptíveis a fagocitose, mas, uma vez ingeridos, são capazes de sobreviver intracelularmente, possivelmente devido à presença de um halo alcalino em sua superfície celular, produzido por íons de amônio/amônia (COLE, 2003).

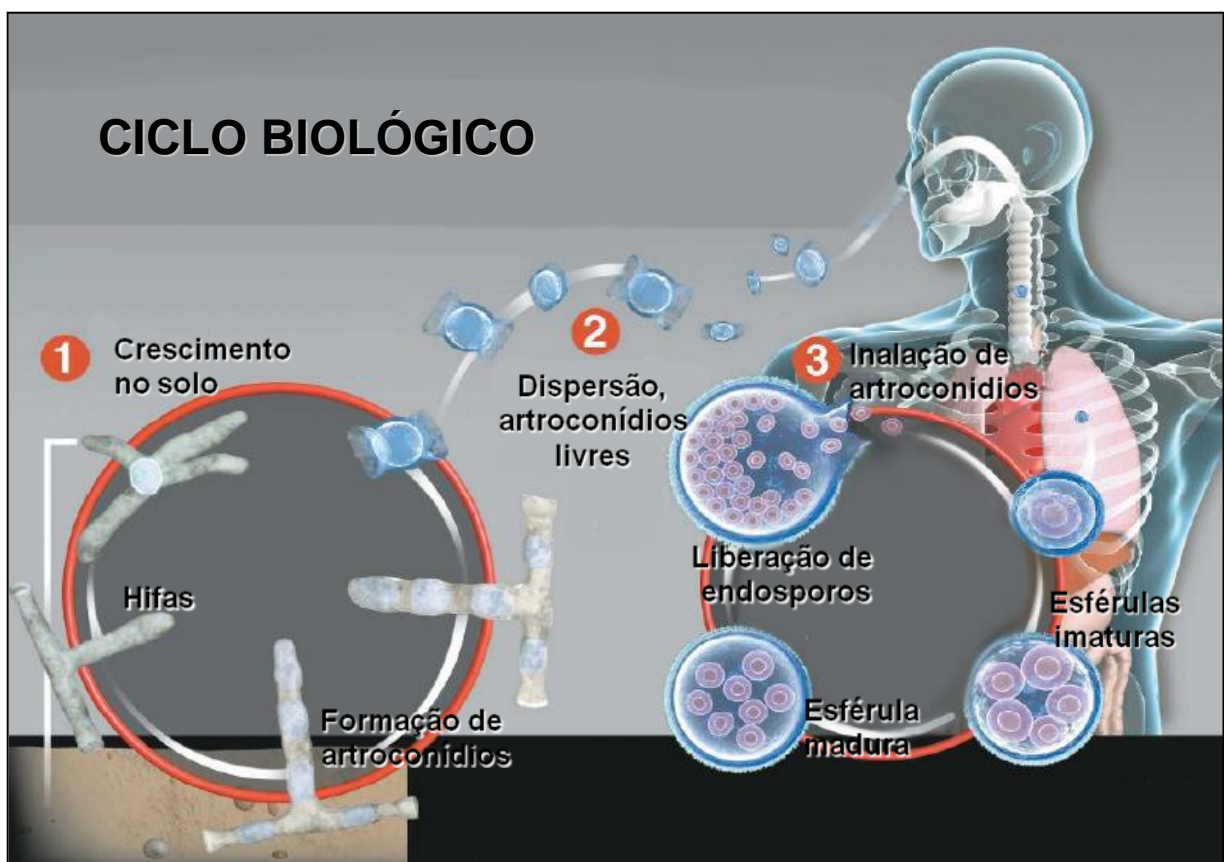


Figura 4. Ciclo biológico de *Coccidioides* spp., demonstrando a fase saprofítica no ambiente (1) e a fase parasitária após a inalação de artroconídios por um hospedeiro susceptível (3). Fonte: Adaptação de HECTOR; LANIADO-LABORÍN, 2005.

Na coccidioidomicose, a imunidade mediada por células é importante para estabelecer uma resposta efetiva à infecção, sendo essencial a participação das células T para a defesa do hospedeiro. O curso clínico pode ser muito influenciado pelo fato da resposta imune ser predominantemente dirigida para um padrão T helper 1 (Th1) ou um padrão T helper 2 (Th2), os quais correlacionam-se, respectivamente, com resistência e susceptibilidade

à infecção por *Coccidioides* spp. (COX; MAGEE, 2004; HUNG; XUE; COLE, 2007). A resposta imune via Th1 caracteriza-se pela produção de interleucina (IL) -2, IL-12, fator necrose tumoral (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ), enquanto, na resposta via Th2, ocorre a liberação de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (HATTON; WEAVER, 2003). A ativação da via Th1 está associada com a resolução espontânea da infecção. Enquanto a ativação da via Th2 leva a susceptibilidade à infecção, já que inibe a resposta do tipo Th1 (COX; MAGEE, 2004; DICAUDO, 2006).

Um dos principais fatores de virulência de *Coccidioides* spp. é uma glicoproteína (SOWgp) da parede exterior das esférulas, que é também considerada um antígeno imunodominante. A resposta imune mediada tanto por células quanto por anticorpos é estimulada por SOWgp (HUNG; XUE; COLE, 2007). A metaloproteinase (Mep1), outro fator de virulência, é produzida durante o ciclo parasitário e digere o antígeno SOWgp da parede das esférulas, a fim de evitar que seja reconhecido pelo sistema imunitário, contribuindo para a habilidade do patógeno em persistir nos tecidos do hospedeiro (HUNG et al., 2005). A secreção de urease pelas esférulas contribui para lesão tissular no hospedeiro. A amônia produzida pela urease gera um microambiente alcalino que aumenta a sobrevivência do fungo no hospedeiro (MIRBOD-DONOVAN et al., 2006). A produção de melanina, ou compostos precursores a ela, é considerada um importante fator de virulência, sendo evidenciada nos artroconídios, esférulas e endósporos de *C. posadasii* (NOSANCHUK et al., 2007).

O gênero *Coccidioides* é considerado um dos mais virulentos e infectantes patógenos do grupo dos fungos, sem predileção por sexo, raça e idade. Ele está enquadrado como agente biológico classe 3, sendo até mesmo considerado agente potencial de bioterrorismo (DERESINSKI, 2003). A manutenção de culturas deste fungo, sua manipulação e transferência devem seguir regras rígidas (WARNOCK, 2007).

A coccidioidomicose apresenta amplo espectro de manifestações clínicas, acarretando desde uma infecção respiratória aguda e autolimitada, na maioria dos casos, ou até mesmo uma doença crônica com disseminação para outros órgãos e sítios (GALGANI et al., 2005). As formas clínicas manifestadas pela doença são: forma pulmonar aguda, pulmonar crônica, disseminada e cutânea primária.

Cerca de 60% dos casos em indivíduos imunocompetentes são assintomáticos, comumente de natureza benigna e resolução espontânea. Dessa forma, ocorre uma dificuldade no reconhecimento da infecção primária, em que apenas evidências sorológicas comprovam o contato com o microrganismo (AMPEL, 2005).

A forma pulmonar aguda apresenta o acometimento das vias respiratórias, causando desde resfriados ou gripes a quadros pneumônicos. Os sintomas podem ser

caracterizados por febre, tosse, dispnéia, dor torácica e quadros inespecíficos de gripe (COX; MAGEE, 2004).

A forma pulmonar crônica manifesta-se em alguns casos relacionados à pacientes diabéticos ou imunocomprometidos, quando os sintomas da forma pulmonar aguda não regredem após dois meses. Os sintomas apresentados são: lesões nodulares ou cavitárias; doença pulmonar fibrocavitária; disseminação miliar pulmonar, com manifestações clínicas e radiológicas inespecíficas (DEUS-FILHO, 2009). Devido a sua evolução progressiva, constitui importante diagnóstico diferencial com a tuberculose pulmonar (CASTAÑEDA-GODOY; LANIADO-LABORIN, 2002; MUÑOZ et al., 2004).

A forma disseminada acomete cerca de 1 a 5% dos pacientes, sendo uma das manifestações graves entre os hospedeiros imunocomprometidos, assumindo importante papel após o surgimento da AIDS (AGUILAR et al., 2001; CRUM-CIANFLONE et al., 2006; BLAIR et al., 2008; FISHER et al., 2010). A enfermidade, que se caracteriza por lesões pulmonares, pode disseminar-se principalmente para a pele, meninges, olhos, linfonodos, tecido subcutâneo, ossos, articulações, coração e sistema urogenital. Quando não diagnosticada e tratada a tempo pode ser fatal (ARSURA; BOBBA; REDDY, 2005; JOHNSON; EINSTEIN, 2006).

A forma cutânea primária decorre de inoculação traumática do microrganismo e está associada a acidentes de laboratório (DICAUDO, 2006). As manifestações dermatológicas observadas são pápulas, nódulos e placas verrucosas que podem evoluir para a formação de úlceras e abscessos (NOOR; RAO, M.; RAO, B., 2008).

1.1.5 Diagnóstico

Um diagnóstico precoce e acurado é importante para a instituição adequada de medidas terapêuticas, reduzindo tanto o uso de medicações como o tempo para o início do tratamento, contribuindo assim para a recuperação do paciente. No entanto, existe uma dificuldade em atingir um diagnóstico precoce nas micoses sistêmicas, devido à falta de métodos de alta sensibilidade e especificidade (YEO; WONG, 2002).

O diagnóstico da coccidioidomicose é determinado através da junção dos dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, sendo este último indispensável para o diagnóstico definitivo, com base em técnicas micológicas, histopatológicas, imunológicas e moleculares (BLAIR et al., 2006).

O diagnóstico micológico de *Coccidioides* spp. é realizado inicialmente através do exame direto, que consiste na visualização de amostras clínicas preparadas em montagem do

tipo lâmina-lamínula, sendo observadas ao microscópio óptico, a fim de detectar estruturas parasitárias do fungo, como esférulas em diferentes estágios de maturação e numerosos endósporos no seu interior (PAIXÃO; ROCHA; SIDRIM, 2004). O hidróxido de potássio é usado no exame direto como um método rápido e facilmente disponível. Os espécimes clínicos mais utilizados são secreções respiratórias, como escarro, aspirado traqueal e lavado broncoalveolar, líquido cefalorraquidiano, aspirados de lesões ósseo-articulares, líquido pleural, biopsias de pele e tecido pulmonar (SUTTON, 2007).

O cultivo do microrganismo é realizado concomitante ao exame direto, e continua sendo padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial definitivo da coccidioidomicose. No entanto, é uma prática que merece cautela, pois acarreta grande risco aos profissionais. Assim, a manipulação destes isolados deve ser realizada em laboratório com nível de contenção biológica 3, seguindo as devidas normas de biossegurança (CORDEIRO, 2006a; SUTTON, 2007).

Os meios de cultura mais utilizados incluem ágar BHI (*Brain Heart Infusion*), ágar batata dextrose e ágar sabouraud dextrose suplementado ou não com cloranfenicol (para evitar o crescimento excessivo de bactérias) e/ou cicloeximida (para evitar crescimento de fungos contaminantes) (SAUBOLLE, 2007). As culturas geralmente são incubadas a temperatura ambiente, na qual o fungo cresce rapidamente entre 3 a 5 dias, apresentando uma colônia inicialmente úmida, membranosa e acinzentada, tornando-se mais tarde algodosa, branca ou creme, podendo formar pigmento difusível no meio (DE HOOG et al., 2000; LACAZ et al., 2002). A análise da micromorfologia realiza-se a partir da coloração com lactofenol azul algodão, sendo observadas hifas hialinas septadas, com a presença de arthroconídeos intercalados por células disjuntoras (WALSH et al., 2003; JOHNSON et al., 2008).

Exames histopatológicos também podem ser utilizados para garantir o diagnóstico da coccidioidomicose através da identificação do fungo em sua fase leveduriforme. As preparações histológicas podem ser realizadas em biópsias de lesão tegumentar, pulmonar, osteoarticular, cerebral ou de outros materiais suspeitos (SAUBOLLE; MCKELLAR; SUSSLAND, 2007). A coloração da prata-metenamina de Grocott-Gomori é uma técnica sensível para identificar fungos em preparações histopatológicas, no entanto pode impedir a visualização dos endósporos no interior das esférulas. Outras colorações histológicas utilizadas são: ácido periódico de Schiff (PAS), Hematoxilina-Eosina (HE) e, em alguns casos, a coloração de Giemsa e coloração de Gram (MOROYUQUI; FIGUEROA, 2008).

Em caso de dificuldade de visualização de estruturas do microrganismo por pesquisa direta ou por isolamento em cultura, o diagnóstico pode ser determinado por

métodos que encontrem indícios indiretos de sua presença, como métodos sorológicos ou moleculares (YEO; WONG, 2002).

Os testes sorológicos são ferramentas auxiliares ao diagnóstico da doença, revelando informações importantes sobre a epidemiologia da doença (WHEAT, 2007; AMPEL et al., 2009). As técnicas imunológicas adotadas, como imunodifusão em gel, contraímunoeletroforese, fixação do complemento, aglutinação em látex e ELISA, apresentam diferentes níveis de sensibilidade e especificidade (SAUBOLLE; MCKELLAR; SUSSLAND, 2007). No entanto, fatores como custo de reagentes, exequibilidade e reprodutibilidade dos testes ainda são decisivos para a prática em laboratórios de rotina, sendo a imunodifusão dupla a técnica mais rápida e de menor custo (DURKIN et al., 2008; CORDEIRO et al., 2009b). A técnica de imunodifusão radial dupla é a mais adotada no Brasil, realizada através do uso de um antígeno comercial (*Immy Immunodiagnostics*, EUA) extraído de cepas norte-americanas de espécies de *Coccidioides*. Desde o ano de 2006, o Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) do Ceará faz uso de um antígeno próprio, extraído de cepas de *C. posadasii*, o qual apresenta resultados satisfatórios no imunodiagnóstico da coccidioidomicose (BRILHANTE et al., 2008; CORDEIRO et al., 2009b; 2010).

A identificação molecular da coccidioidomicose atua como uma ferramenta complementar ao diagnóstico laboratorial. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é o método mais utilizado, muitas vezes associada à hibridização de ácidos nucléicos (BIALEK, 2004). Atualmente, existe a possibilidade de realização de testes diretamente de amostras clínicas, como a aplicação da técnica de PCR a partir de amostra de escarro, apresentando um diagnóstico rápido, como demonstrado por Cordeiro et al. (2007). Apesar de envolverem menor risco biológico e apresentarem elevados níveis de especificidade e sensibilidade, essas técnicas são consideradas ferramentas complexas que possuem aplicação limitada pelo seu custo elevado (BINNICKER et al., 2007; TINTELNOT et al., 2007).

1.1.6 Tratamento

O tratamento da coccidioidomicose a ser aplicado depende da forma clínica apresentada pelo paciente. No caso de infecções pulmonares localizadas e sem risco de complicações, na maioria das vezes é preciso apenas de uma reavaliação periódica para verificar a resolução espontânea da infecção. No entanto, quando se trata de um quadro de disseminação com riscos de complicações devido à imunossupressão, a exigência é maior com relação ao tratamento, incluindo terapia com drogas antifúngicas e/ou intervenção

cirúrgica, com duração de meses a anos, ou mesmo ao longo da vida supressiva do paciente, quando necessário (GALGIANI et al., 2005).

As principais drogas antifúngicas utilizadas são a anfotericina B, voltada para os casos graves da doença, e derivados azólicos como cetoconazol, itraconazol e fluconazol, usados principalmente nas manifestações leves ou moderadas (DICAUDO, 2006). De acordo com o Ministério da Saúde (2008), o tratamento recomendado para coccidioidomicose é uma dose total de 1 a 3g de anfotericina B, seguido da aplicação de 400mg/dia de fluconazol ou 300mg/dia de itraconazol por um período de 6 a 12 meses.

A anfotericina B é voltada para os casos graves da doença, quando é preciso de uma ação antifúngica mais rápida. Esta terapêutica geralmente é seguida de uma terapia complementar com um triazólico até o paciente atingir a cura (STANLEY et al., 2008). Devido à elevada toxicidade de anfotericina B, esta tem sido substituída pelos derivados azólicos no tratamento da maioria das infecções pulmonares crônicas ou disseminadas (JOHNSON; EINSTEIN, 2007). O cetoconazol, apesar de possuir certo grau de toxicidade, ainda é utilizado em alguns casos de formas crônicas da doença. O tratamento com fluconazol vem alcançando resultados satisfatórios, apesar de alguns casos de recidivas. Esta droga é especialmente indicada nas formas que comprometem o sistema nervoso central, devido sua boa difusão cerebral, sendo então utilizado para o tratamento da meningite coccidióidica. O itraconazol tornou-se a droga de escolha na terapêutica da coccidioidomicose, apresentando resultados um pouco melhores do que o uso de fluconazol, e sendo muito mais tolerado pelo paciente do que o cetoconazol (GALGIANI et al., 2005).

Atualmente, existem novas drogas antifúngicas que podem trazer benefícios para o tratamento da coccidioidomicose. Os triazólicos voriconazol e posaconazol têm mostrado resultados eficazes em alguns casos da doença, principalmente com relação a infecções refratárias (PROIA; TENORIO, 2004; STEVENS et al., 2007). No grupo das equinocandinas, vale destacar a caspofungina, micafungina e anidulafungina. Apenas a caspofungina possui uso clínico autorizado, mostrando excelente ação terapêutica em estudo com coccidioidomicose experimental em modelos murinos (GONZALEZ et al., 2001) e no tratamento de um paciente que apresentava um quadro de disseminação da doença (ANTONY, 2004).

1.2 Histoplasmose

1.2.1 Aspectos históricos

Em 1906, a histoplasmose foi descrita pela primeira vez pelo médico Samuel Taylor Darling que, ao realizar o exame microscópico de fragmentos do pulmão, fígado e baço, observou parasitas intracelulares, sugerindo tratar-se de um protozoário com uma suposta cápsula envolvente, sendo assim denominado *Histoplasma capsulatum* (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE, 2005). No entanto, somente em 1912, o patologista Henrique da Rocha Lima verificou que na verdade tratava-se de um fungo (WANKE; LAZÉRA, 2004).

Em 1945, surgiram os primeiros inquéritos epidemiológicos com histoplasmina, que revelaram as formas subclínicas da micose, comprovando ser uma doença cosmopolita e de transmissão respiratória (WANKE; LAZÉRA, 2004). Em 1949, Emmons conseguiu isolar pela primeira vez o agente infeccioso a partir do solo na cidade de Maryland (EUA), verificando que a presença do fungo tinha relação com excretas de aves ou morcegos (EMMONS, 1956). No Brasil, Fava Netto et al. (1967) realizaram o primeiro isolamento do fungo a partir de excretas de morcegos na cidade de São Paulo, sendo registrado posteriormente relatos de isolamento do microrganismo também a partir de vísceras e sangue de morcegos.

Em meados de 1948, nos EUA, foram descritos os primeiros casos de histoplasmose pulmonar crônica, em pacientes que eram tratados para tuberculose antes mesmo de confirmarem tratar-se de uma doença fúngica. Este fato ocorria devido à semelhança das manifestações clínicas da doença com a tuberculose pulmonar (FERREIRA; BORGES, 2009).

No Brasil, o primeiro caso da doença foi diagnosticado em 1939 por Almeida e Lacaz, que isolaram o agente a partir de fragmentos de biópsia numa lesão de cromoblastomicose. Posteriormente, no ano de 1941, os mesmos pesquisadores isolaram o fungo novamente, a partir de amostras de escarro de um paciente que estava sendo tratado para tuberculose (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE, 2005). Nos anos 1945 e 1959, foram descritas as formas disseminada crônica e pulmonar crônica da doença, respectivamente (CAPONE et al., 1999).

Os casos de histoplasmose disseminada eram associados a quadros de imunossupressão, uso de drogas imunossupressoras, extremos de idade ou causa desconhecida. A partir da década de 1980 a AIDS tornou-se a principal doença predisponente para histoplasmose disseminada (CHANG et al., 2007). Posteriormente, a histoplasmose foi

considerada um fator indicador para diagnóstico de AIDS (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002).

1.2.2 O gênero *Histoplasma*

A espécie *H. capsulatum* apresenta três variantes: var. *duboisii*, var. *capsulatum* e var. *farciminosum*, sendo as duas primeiras patogênicas ao homem e a terceira causadora de linfangite epizootica em equinos (PELLATON et al., 2009). A variedade *duboisii* causa a doença conhecida como histoplasmose africana, encontrada somente na região central, oeste da África e Madagascar (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006). Já a variedade *capsulatum* causa histoplasmose clássica ou capsulata, uma doença sistêmica cosmopolita que ocorre nos Estados Unidos, América Latina, Ásia e África (ROSSINI; GOULART, 2006; KAUFFMAN, 2006). Alguns fatores como clima temperado ou tropical e solos úmidos podem contribuir para a disseminação do fungo nessas regiões (WHEAT et al., 2007).

H. capsulatum var. *capsulatum* e *H. capsulatum* var. *duboisii* possuem características morfológicas muito semelhantes em sua fase filamentosa, sendo verificado uma diferença apenas na fase leveduriforme, no qual a variedade *duboisii* em tecidos animais apresenta células ovais com maior dimensão e parede mais espessa do que a variedade *capsulatum* (PELLATON et al., 2009). O presente trabalho dará enfoque à variedade *capsulatum*, a qual será identificada apenas como *H. capsulatum*, a partir deste momento.

Taxonomicamente, a espécie *H. capsulatum* pertence à Família Ajellomycetaceae, Ordem Onygenales, Classe Eurotiomycetes e Filo Ascomycota (DE HOOG et al., 2000; KASUGA et al., 2003). Este fungo é caracterizado pelo seu dimorfismo térmico, apresentando-se sob duas formas dependendo da temperatura, a forma filamentosa e a forma leveduriforme (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006).

A uma temperatura variando entre 25 a 30°C, *H. capsulatum* apresenta-se sob a forma filamentosa ou fase saprofítica, caracterizada macromorfológicamente pela presença de colônias brancas, de textura algodoadosa e micélio aéreo (Figura 5A) (FERREIRA; BORGES, 2009). Microscopicamente, o fungo apresenta hifas hialinas septadas e ramificadas que dão origem a macroconídios ou conídios tuberculados e a microconídios (Figura 5B). Os macroconídios medem cerca de 8 a 15 µm de diâmetro, possuem paredes espessas com septos distintos e projeções digitiformes. Os microconídios são estruturas pequenas e ovais de paredes lisas e ramificadas com 1-4 x 2-6 µm de diâmetro que, devido a sua pequena

dimensão, são de fácil aerolização, sendo considerados os principais propágulos infectantes deste fungo (KAUFFMAN, 2006).

Na forma leveduriforme ou fase parasitária, nos tecidos do hospedeiro a 37°C, o fungo é caracterizado macromorfológicamente pela presença de colônias cremosas, úmidas, brilhantes e lisas (Figura 6A). Microscopicamente, o microrganismo apresenta células ovais uninucleadas medindo cerca de 3 a 5 µm de diâmetro (Figura 6B) (FERREIRA; BORGES, 2009). A conversão da forma filamentosa para a forma leveduriforme deste fungo *in vitro* é de difícil execução, pois depende de condições especiais, como requerimento nutritivo do meio de cultura - ágar Sabouraud ou ágar BHI com sangue de carneiro, temperatura e metodologia adequada (WOODS, 2002).

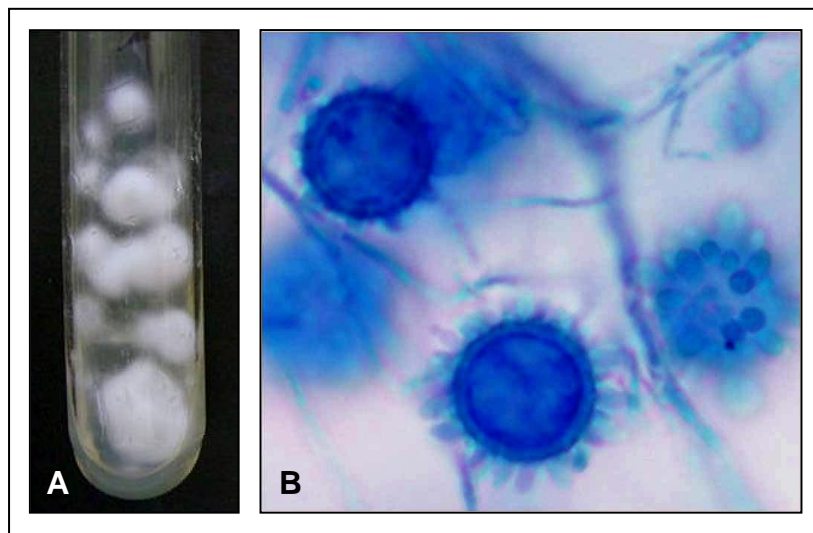


Figura 5. Aspecto morfológico de *H. capsulatum* na fase filamentosa. **A.** Macromorfologia em ágar batata; **B.** Micromorfologia, mostrando hifas septadas e macroconídios tuberculados. Fonte: CEMM, 2010.

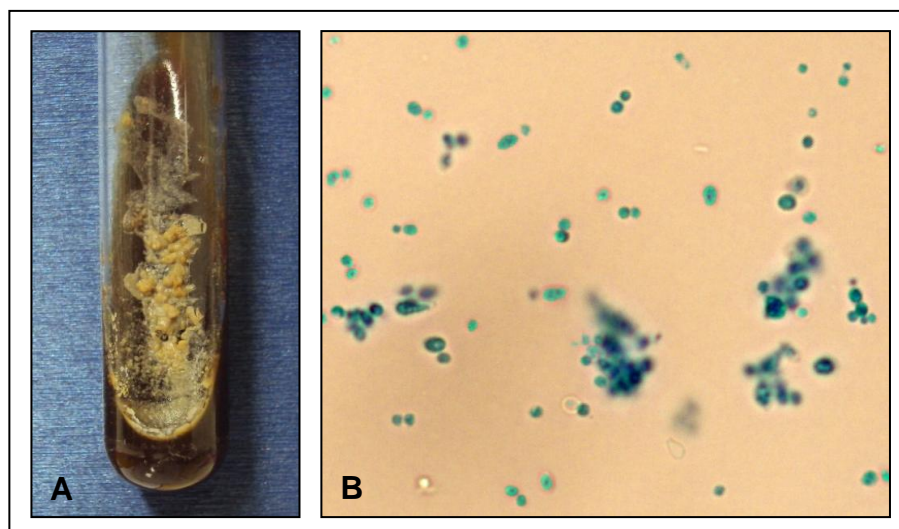


Figura 6. Aspecto morfológico de *H. capsulatum* na fase leveduriforme. **A.** Macromorfologia em ágar BHI com sangue de carneiro 10%; **B.** Micromorfologia, mostrando células ovais uninucleadas. Fonte: CEMM, 2010.

H. capsulatum é capaz de infectar o homem, causando doença respiratória e sistêmica. Após a inalação de conídios infectantes, a conversão do fungo para a forma leveduriforme ocorrerá nos pulmões, podendo a partir daí migrar para outros órgãos do corpo dentro ou fora de células hospedeiras, como os monócitos e macrófagos (LÓPEZ, 2006; BOHSE; WOODS, 2007).

H. capsulatum pode ser encontrado na sua forma de micélio em solos ricos de compostos nitrogenados, pH ácido, alta umidade e, contaminados com fezes de alguns animais, como aves, morcegos ou pássaros, sendo, dessa maneira, isolado em determinados locais como galinheiros, cavernas, ocos de árvores e casas abandonadas. Estes ambientes são ricos em carboidratos, nitrogênio e fosfato que favorecem sua sobrevivência e inibem o crescimento de organismos competidores (ROSSINI; GOULART, 2006). Parques e praças também são locais onde provavelmente o fungo pode ser encontrado, devido à enorme quantidade de excretas de aves ou pássaros existente (LYON et al., 2004). Atividades como limpeza de sótãos ou celeiros, demolição de prédios antigos e revolvimento de solos podem estar relacionadas a casos de histoplasmose (KAUFFMAN, 2009).

Os quirópteros são susceptíveis à infecção, os quais podem abrigar o fungo na mucosa intestinal e adubar o solo com suas fezes contaminadas, disseminando-o assim para outros locais, sendo considerados reservatórios do *H. capsulatum* (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE, 2005). Ainda não houve relatos de casos em aves, possivelmente devido à sua temperatura corpórea elevada (WANKE; LÁZERA, 2004).

1.2.3 Epidemiologia

A histoplasmose apresenta zonas endêmicas ao longo das Américas, sendo encontrada nas regiões centrais e sul dos Estados Unidos, nos vales dos rios Mississipi e Ohio, no México, em várias ilhas do Caribe e em países sul-americanos, como o Brasil. Em algumas regiões da África, Ásia e Europa têm sido relatados casos da doença, sendo considerados esporádicos e autóctones (FERREIRA; BORGES, 2009).

Inquéritos epidemiológicos são realizados através da observação de casos e do teste cutâneo da histoplasmina, que por sua vez é uma importante técnica a qual indica se indivíduos foram sensibilizados por *H. capsulatum*. No entanto, não possui a capacidade de diferenciar infecções passadas ou recentes (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE, 2005; ROSSINI; GOULART, 2006).

No Brasil, a ocorrência da histoplasmose se dá através da observação de casos clínicos autóctones comprovados por inquéritos epidemiológicos empregando testes cutâneos,

sendo as regiões do sul e sudeste as que apresentam maior frequência de casos (MORAIS et al., 2008). O reconhecimento das áreas de maior incidência é facilitado por alguns fatores, como o alto índice de positividade ao teste de histoplasmina, registro de ocorrência de casos da doença e o isolamento do fungo no solo (OLIVEIRA; UNIS; SEVERO, 2006).

O número de casos de histoplasmose vem crescendo em várias regiões do Brasil, principalmente na Amazônia e Rio Grande do Sul, com registro de 194 casos da forma disseminada da doença em pacientes com AIDS no período de 1987 a 2002 (UNIS; OLIVEIRA; SEVERO, 2004). Outros casos têm sido relatados nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Goiás, ocorrendo geralmente em indivíduos que chegaram a visitar grutas habitadas por morcegos ou participaram de atividades em cavernas, apresentando histoplasmose pulmonar aguda (CURY et al., 2001; LACAZ et al., 2002). Cerca de 26 microepidemias já foram registradas nos Estados do Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo, Distrito Federal, Minas Gerais, Paraíba, Amazônia e Bahia (UNIS; OLIVEIRA; SEVERO, 2004).

Recentemente, Deus Filho et al. (2009) evidenciaram a ocorrência de casos nos Estados do Maranhão e Piauí. No Ceará, estudos registraram 164 casos de histoplasmose no período de 1995 a 2004, e 161 casos no período de 2008 a 2009, todos em pacientes HIV positivos em hospitais da rede pública de Fortaleza, sendo dessa maneira, a cidade de Fortaleza considerada uma área de prevalência da histoplasmose (DAHER et al., 2006). Fatores como presença de mangueira com morcegos frutíferos ou de galinheiro na vizinhança, prática de atividades com terra e visitas a sítio foram destacados como as principais características que contribuíram para infecção por *H. capsulatum* (BEZERRA, 2009).

1.2.4 Patogenia, aspectos clínicos e imunológicos

Durante o revolvimento do solo contaminado por *H. capsulatum*, o hospedeiro acaba inalando os propágulos infectantes, formados por microconídios e fragmentos de micélio, os quais são depositados nos alvéolos pulmonares, onde as partículas são envolvidas por macrófagos, e expostas a diversos produtos de oxidação e enzimas degradativas (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE, 2005). No interior dos macrófagos a 37°C, o microrganismo submete-se a conversão para sua forma leveduriforme. Após vencer esta barreira de defesa inespecífica, o fungo é transportado por via linfática até os linfonodos mediastinais, onde forma o complexo pulmonar ganglionar primário. Posteriormente, ocorre disseminação para outros órgãos por via hematogênica, antes mesmo que o hospedeiro

consiga reagir com imunidade específica, concluindo assim a trajetória da infecção (Figura 7) (ZANCOPE-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE, 2005; KAUFFMAN, 2006).

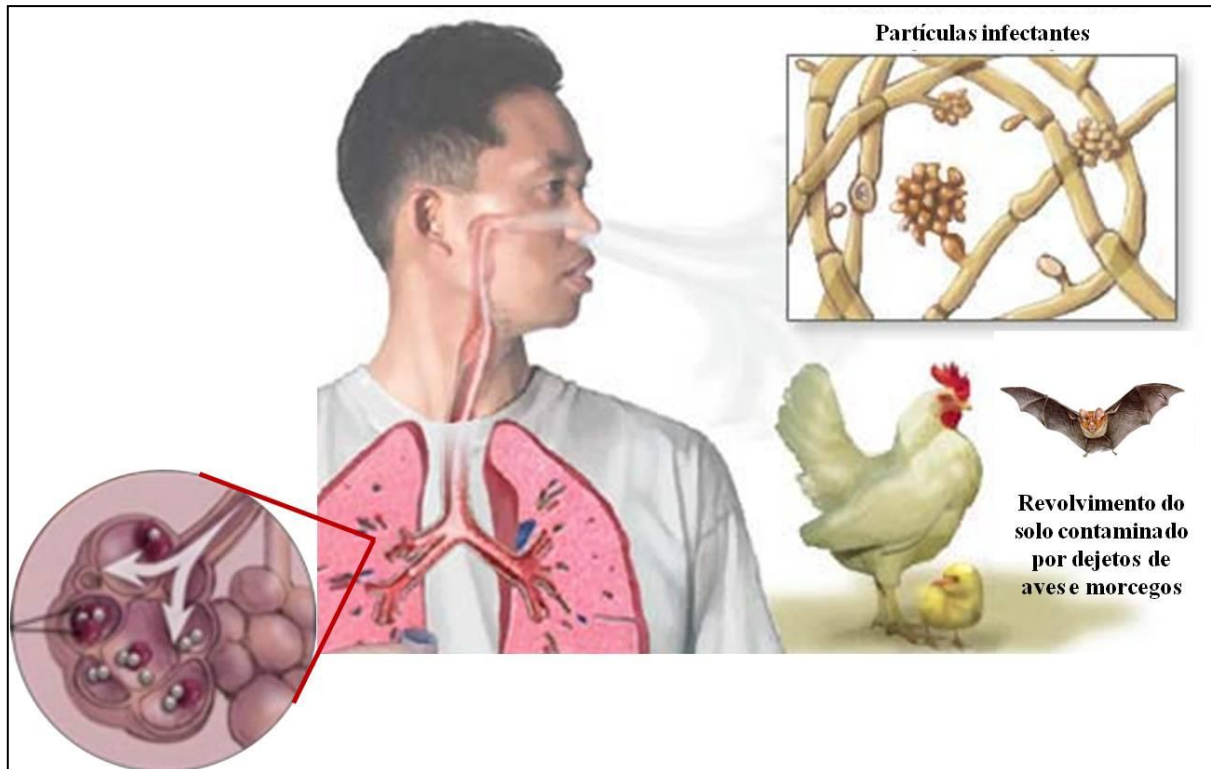


Figura 7. Ciclo biológico de *H. capsulatum*, demonstrando a fase saprofítica no ambiente e a fase parasitária após a inalação de conídios por um hospedeiro susceptível. Fonte: Figura adaptada do endereço eletrônico www.nytimes.com.

Entre o décimo ou décimo oitavo dia após o início da infecção primária, a imunidade celular é ativada no organismo do hospedeiro, sendo controlada pelas células T auxiliares do sistema imune, as quais vão reconhecer antígenos da parede celular fúngica e secretar $\text{INF-}\gamma$ e citocinas do tipo IL-2 e IL-12, ativando os macrófagos para destruírem as formas leveduriformes intracelulares de *H. capsulatum* e assim alcançarem o controle da infecção (KAUFFMAN, 2006; FERREIRA; BORGES, 2009). O sistema imune de hospedeiros imunocompetentes consegue atingir este controle da infecção, acarretando a uma reação granulomatosa seguida de cicatrização, fibrose e calcificação. Em caso contrário, o fungo dissemina-se para outros órgãos, como fígado e baço, sendo capaz de sobreviver durante muitos anos e reativar-se durante um quadro de imunodepressão (KAUFFMAN, 2009).

A histoplasmose humana é considerada uma doença rara, restrita a surtos endêmicos, que ganhou uma importância com relação a sua frequência e caráter oportunista em casos de pacientes imunodeprimidos (ANDREU et al., 2003). Cerca de 90% das pessoas

infectadas por *H. capsulatum* são assintomáticas. Em pacientes imunocompetentes, a doença regride de modo espontâneo, causando apenas sintomas semelhantes a uma infecção viral respiratória. A evolução da doença depende da quantidade inalada de propágulos e do estado imune do hospedeiro (ROSSINI; GOULART, 2006; KAUFFMAN, 2009).

A histoplasmose possui as seguintes manifestações clínicas: doença pulmonar aguda, doença pulmonar crônica e disseminada (SEGURO; SILVEIRA, 2008). A doença pulmonar aguda causada pelo *H. capsulatum* é na maioria das vezes regressiva, sendo considerada um caso de alerta quando uma grande quantidade de conídios for inalada, o que pode provocar um sério quadro pulmonar agudo, cujos sintomas chegam a desaparecer após duas a quatro semanas (ROSSINI; GOULART, 2006; FERREIRA; BORGES, 2009).

A histoplasmose pulmonar crônica é verificada principalmente em indivíduos tabagistas com mais de 50 anos de idade e portadores de doença pulmonar crônica obstrutiva (FERREIRA; BORGES, 2009), os quais podem apresentar os seguintes sintomas: febre, perda de peso, sudorese noturna, dor torácica e tosse. Este quadro assemelha-se bastante a tuberculose pulmonar crônica, e por ser frequentemente confundido, vários pacientes acabam submetendo-se a um tratamento para tuberculose mesmo antes da confirmação do diagnóstico para histoplasmose. No entanto, apesar da terapia prévia, os pacientes só apresentam melhora clínica após o tratamento com os antifúngicos (UNIS; SEVERO, 2005). Dessa maneira, é necessário realizar exames específicos que determinem o diagnóstico da histoplasmose (COUPPIÉ et al., 2006).

A forma disseminada ocorre principalmente em pessoas com imunidade celular baixa, pacientes com neoplasias hematológicas, transplantados ou usuários de drogas imunossupressoras (SEGURO; SILVEIRA, 2008). Os pacientes HIV positivos são os mais afetados, muito embora um pequeno número de pessoas saudáveis ou que apresentam alguma forma de imunodepressão chegam a desenvolver a histoplasmose disseminada. Os sintomas mais observados são o aumento do fígado, baço e linfonodos, e mais raramente a produção de úlceras na boca e no intestino. Este quadro clínico pode ser fatal em 90% dos casos, quando não tratado a tempo (FERREIRA; BORGES, 2009).

1.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da histoplasmose deve reunir dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. O diagnóstico laboratorial é indispensável para a confirmação de um caso de suspeita de histoplasmose, sendo realizado primeiramente através da coleta de amostras clínicas, como esfregaços de medula óssea, sangue periférico, escarro, líquido e tecidos

biopsiados do indivíduo infectado, as quais são levadas a um laboratório especializado, para análise e identificação do microrganismo (ROSSINI; GOULART, 2006).

Para tanto, é realizado o exame microscópico direto da amostra clínica, procedimento simples e de baixo custo. No entanto, esta é uma técnica de baixa sensibilidade para *H. capsulatum*, devido às pequenas dimensões do parasita, causando dificuldade no seu reconhecimento microscópico (COUPPIÉ et al., 2006; ROSSINI; GOULART, 2006).

A cultura fúngica continua sendo o “padrão ouro” dentre os métodos utilizados para diagnóstico da doença. As amostras são cultivadas a 25 - 30°C, em meios próprios para o isolamento fúngico, como: ágar Sabouraud dextrose 2% ou ágar BHI, suplementados ou não com cloranfenicol e cicloheximida. Após o período de incubação, pode ser evidenciado crescimento fúngico, caracterizado por colônias brancas e algodosas. Em seguida, recomenda-se analisar a microscopia fúngica a partir da coloração com lactofenol azul-algodão, sendo visualizadas estruturas como hifas hialinas septadas com presença ou não de macroconídios tuberculados e microconídios (COUPPIÉ et al., 2006; ROSSINI; GOULART, 2006).

O exame histopatológico dos tecidos é realizado através da visualização de macrófagos parasitados com células leveduriformes em cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina (HE), Giemsa ou coloração da prata-metenamina de Grocott-Gomori. As células leveduriformes se apresentam sob formas esféricas ou ovaladas, rodeadas por uma parede celular muito fina e hialina (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE, 2005).

O uso de testes sorológicos é importante principalmente para os casos de doença primária ou doença pulmonar crônica. Técnicas como a Reação de Fixação do Complemento e Imunodifusão dupla são muito utilizadas. O teste de Imunodifusão dupla é muito empregado no diagnóstico de micoses sistêmicas e conhecido mundialmente por ser uma prova de rápida e fácil execução, mostrando-se mais específica do que a Reação de Fixação do Complemento (KAUFFMAN, 2006). Outra técnica utilizada é o Radioimunoensaio, o qual apresenta bastante sensibilidade para detecção de antígenos polissacarídeos de *H. capsulatum*. No entanto, não é muito adotado nos laboratórios de rotina, devido a sua complexidade técnica (COUPPIÉ et al., 2006).

Os métodos moleculares são considerados excelentes ferramentas para o diagnóstico de histoplasmose, capazes de confirmar os dados dos testes sorológicos de detecção de antígenos (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006). Atualmente, as técnicas disponíveis e mais utilizadas são a hibridização de nucleotídeos e PCR, que trazem como vantagem a diminuição do tempo de espera dos resultados,

apresentando maiores índices de sensibilidade e especificidade (ZANCOPE-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE, 2005).

1.2.6 Tratamento

A escolha do tratamento depende da forma clínica da doença e do estado imune do hospedeiro. A anfotericina B continua sendo a principal droga para a terapêutica da histoplasmose, apesar do seu efeito nefrotóxico, sendo utilizada principalmente nos casos mais severos (KAUFFMAN, 2009).

Entretanto, muitos estudos demonstraram a eficiência dos derivados azólicos contra essa doença, sendo usados também nas formas disseminadas (FERREIRA; BORGES, 2009). O cetoconazol é raramente empregado no tratamento da histoplasmose atualmente, muito embora fosse utilizado no passado como alternativa a anfotericina B. O fato se deve por sua fraca absorção diante da redução do ácido gástrico, acarretando baixa resposta ao tratamento, principalmente em pacientes com AIDS (WHEAT; KAUFFMAN, 2003). Devido à resistência de *H. capsulatum* ao mecanismo de ação de fluconazol, esta droga têm mostrado baixa eficácia quando comparada a anfotericina B e itraconazol (WHEAT et al., 2006). Já o itraconazol é considerado a droga de primeira escolha para o tratamento da histoplasmose pulmonar aguda (KAUFFMAN, 2009). Muitos estudos têm confirmado sua eficácia no tratamento de várias formas clínicas da doença, sendo o seu uso sugerido por alguns autores para o tratamento de histoplasmose disseminada em pacientes com AIDS (FERREIRA; BORGES, 2009). Em casos de pacientes intolerantes ao itraconazol, recomenda-se utilizar o voriconazol e o posaconazol como fármacos de “segunda escolha” para o tratamento da histoplasmose. Outros azólicos apresentam atividade *in vitro* frente a *H. capsulatum*, como ravuconazol e isavuconazol (WHEAT et al., 2006; KAUFFMAN, 2009).

Até o momento não há trabalhos na literatura que relatem sobre o tratamento da histoplasmose com equinocandinas em seres humanos. Alguns autores chegaram a demonstrar sua ineficácia quando comparada com a anfotericina B, no tratamento da doença em modelo murino, não sendo então recomendado seu uso na terapia da histoplasmose (WHEAT et al., 2007; KAUFFMAN, 2009).

Medidas preventivas específicas para a histoplasmose devem ser implantadas, através de atividades educativas que orientem e alertem a população ao risco de infecção, como a limpeza de galinheiros e celeiros, e o uso de máscaras apropriadas para indivíduos com risco de exposição a locais suspeitos ou contaminados (ZANCOPE-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE, 2005).

1.3 Drogas antifúngicas

A frequência das micoses profundas e oportunistas vem aumentando no mundo inteiro. Este aumento pode estar relacionado às doenças imunossupressoras, e ao desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico micológico que auxiliam na detecção de novos casos (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004). Atualmente, a terapia disponível para o tratamento das infecções fúngicas sistêmicas é restrita a poucas classes de drogas (GONZÁLEZ, 2009), sendo a anfotericina B, derivados azólicos e equinocandinas os principais fármacos utilizados, os quais se diferenciam quanto aos seus mecanismos de ação (FIANCHI et al., 2007; PETRIKKOS; SKIADA, 2007). O arsenal terapêutico limitado e a resistência de algumas espécies patogênicas às drogas acabam acarretando dificuldades no tratamento. Casos de refratariedade têm sido observados e podem estar relacionados à capacidade do patógeno fúngico burlar a ação das drogas, causada pela sua adaptação ao hospedeiro (SIDRIM; ROCHA, 2004). Dessa forma, o interesse na busca por novas drogas antifúngicas se faz presente.

1.3.1 Anfotericina B

A anfotericina B (AMB) é um macrolídeo poliênico descoberto em 1955, produzido pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*. É o agente antifúngico mais utilizado no tratamento das micoses sistêmicas, sendo considerado o “padrão ouro” dos fármacos antimicóticos, apesar da sua elevada toxicidade (FILIPPIN; SOUZA, 2006). AMB é 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).

O mecanismo de ação de AMB é caracterizado pela ligação com esteróides da membrana plasmática dos fungos, em especial o ergosterol, um componente cuja função é regular a fluidez da membrana, conferindo-lhe estabilidade, assimetria e integridade. Esta interação acarreta a formação de poros e canais ao longo da membrana que alteram sua permeabilidade, permitindo o extravasamento de eletrólitos do meio intracelular para o meio extracelular, como íons K^+ , PO_4^{3-} , nucleotídeos e algumas proteínas, conseqüentemente levando à morte celular do microrganismo (Figura 8) (CATALÁN; MONTEJO, 2006).

Devido à semelhança entre as estruturas moleculares do ergosterol das células fúngicas e do colesterol presente nas células dos mamíferos, a anfotericina B têm dificuldades

em diferenciá-los, podendo ligar-se também ao colesterol, o que pode explicar o efeito tóxico do fármaco (HUANG et al., 2002).

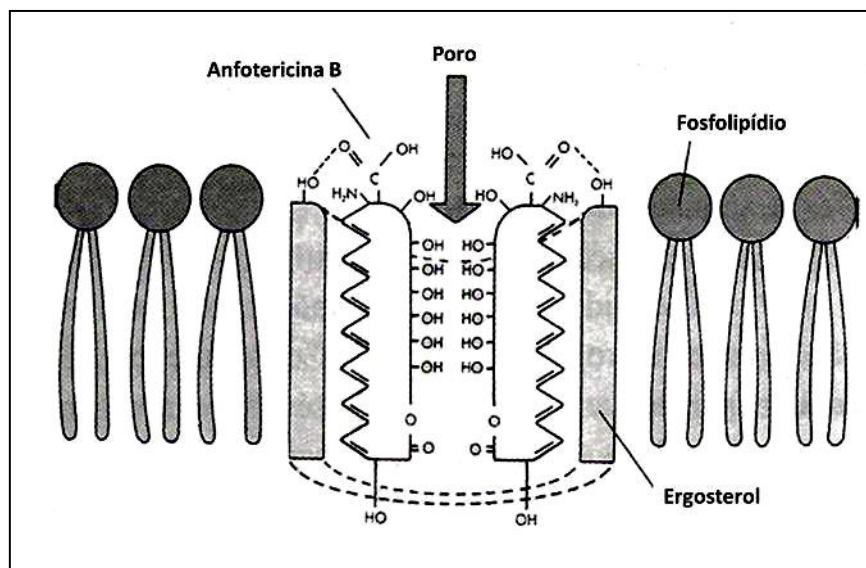


Figura 8. Mecanismo de ação da Anfotericina B. Fonte: SALLES, J.; SALLES, M., 2000.

A droga possui atividade *in vitro* frente aos fungos dimórficos *H. capsulatum*, *Coccidioides* spp. e *Blastomyces dermatitidis*, bem como algumas espécies de *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Cryptococcus* spp. (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008). Algumas espécies de *Candida* spp. e outros fungos filamentosos apresentam resistência *in vitro* a AMB, apresentando concentração inibitória mínima (CIM) superior a 1 - 2 µg/mL. Esta resistência deve-se à redução da síntese do ergosterol, sendo substituído por outros esteróis da membrana fúngica que possuem baixa afinidade a AMB (THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009).

Com relação à atividade antifúngica *in vivo*, AMB possui uma ação fungistática ou fungicida, que vai depender da sensibilidade do microrganismo ou da sua concentração no sítio de infecção (CATALÁN; MONTEJO, 2006). A droga é utilizada na terapia contra infecções causadas pelos principais fungos dimórficos patogênicos e leveduras, como *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. (MARTINEZ, 2006). No entanto, algumas espécies de *Candida* spp., *Trichosporon* spp. e *Fusarium* spp. apresentam resistência clínica a AMB (LUMBRERAS; LIZASOAIN; AGUADO, 2003).

Devido à nefrotoxicidade e algumas reações adversas causadas por AMB durante o tratamento, diferentes formulações da droga foram desenvolvidas com o objetivo de diminuir sua toxicidade sem alterar a eficácia, possuindo menor afinidade ao colesterol e o mesmo mecanismo de ação eficiente. São elas: complexo lipídico de anfotericina B (Abelcet®, The Liposome Company Inc., Princeton, NJ, Reino Unido); anfotericina B em

dispersão coloidal (Amphocil®, Sequuspharmaceuticals Inc., Menlo Park, CA, EUA); e anfotericina B lipossomal (AmBisome®, Fujisawa Healthcare Inc., Deerfield, IL, EUA), todas aprovadas na década de 90, pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

Diversos autores relatam o sinergismo presente na associação de AMB e 5-fluorocitosina na maioria dos casos, sendo normalmente indicada para o tratamento de criptococose e aspergilose (JOHNSON et al., 2004). Estudos realizados por Medrano (2010), verificaram a ação sinérgica do azólico voriconazol com anfotericina B *in vitro* frente à cepas de *C. posadasii*, necessitando da realização de futuros ensaios clínicos controlados a fim de definir a segurança e utilidade desta combinação na terapia antifúngica.

1.3.2 Derivados azólicos

O estudo da atividade antifúngica dos derivados azólicos iniciou-se com o benzimidazol, no final da década de 60. A partir daí, surgiram os derivados imidazólicos, dotados de amplo espectro de atividade antimicrobiana, representados principalmente pelo miconazol e o cetoconazol (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006; CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008). Posteriormente, novas manipulações do núcleo imidazólico geraram os triazólicos fluconazol, itraconazol, e, mais recentemente os triazólicos de segunda geração voriconazol e dois novos representantes que ainda encontram-se em fase de pesquisa, o posaconazol e o ravuconazol (MARTINEZ, 2006).

Os azólicos são compostos totalmente sintéticos, fungistáticos, caracterizados por um anel pentagonal na estrutura molecular, formado por três átomos de carbono e dois átomos de nitrogênio (imidazólicos), ou dois átomos de carbono e três átomos de nitrogênio (triazólicos) (CATALÁN; MONTEJO, 2006). Assim, a classificação deste grupo de fármacos em imidazólicos ou triazólicos se dá pelo número de nitrogênios presentes no anel de sua estrutura. Qualquer mudança na estrutura química da molécula altera as propriedades físico-químicas e terapêuticas específicas de cada quimioterápico (LUMBRERAS; LIZASOAIN; AGUADO, 2003).

O mecanismo de ação dessas drogas consiste no bloqueio da biossíntese do ergosterol, impedindo a ação da enzima 14- α -demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica, que, por conseguinte, evita a demetilação do precursor lanosterol em ergosterol (Figura 9) (CATALÁN; MONTEJO, 2006). A carência de ergosterol provoca o acúmulo de compostos metilesteróis, que levam à formação de uma membrana com propriedades alteradas, não desempenhando as funções básicas necessárias ao

desenvolvimento fúngico (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004). Outra consequência que pode ocorrer é a lise celular, causada pelo aumento da permeabilidade da membrana que desencadeia várias alterações morfológicas (CAZEDEY et al., 2007).

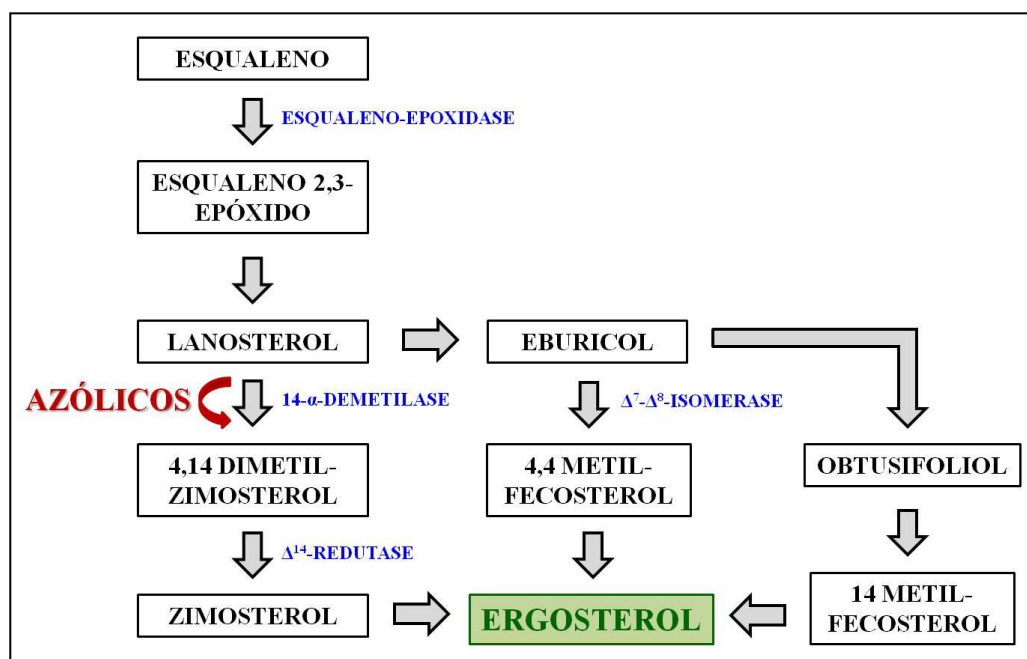


Figura 9. Mecanismo de ação dos derivados azólicos. Fonte: Adaptação de SIDRIM; ROCHA, 2004.

A especificidade dos azóis decorre de maior afinidade pelas enzimas do citocromo P-450 dos fungos do que pelas enzimas dos seres humanos. Os imidazóis apresentam menor grau de especificidade do que os triazóis, o que explica a sua maior incidência de interações medicamentosas e efeitos colaterais (MARTINEZ, 2006).

O espectro de ação *in vitro* dos azólicos é amplo, abrangendo leveduras, fungos filamentosos e dimórficos (CUENCA-ESTRELLA et al., 2006). No entanto, algumas espécies podem apresentar resistência, ocorrendo através de múltiplos mecanismos. Alterações na enzima 14- α -demetilase e aumento do efluxo das drogas são algumas das causas, sendo constatado particularmente em espécies de *Candida* spp. Além disso, o uso excessivo dos azólicos levou ao aparecimento de resistência em espécies suscetíveis (MARTINEZ, 2006).

O fluconazol possui atividade *in vitro* contra *Candida* spp., apresentando CIM superior ou igual a 2 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, segundo Sabatelli et al. (2006), cepas com CIM superior a 32 $\mu\text{g/mL}$ são consideradas resistentes. Os valores de CIM para fluconazol são geralmente maiores que outros azólicos para algumas espécies de fungos dimórficos (GONZÁLEZ, 2009). O itraconazol apresenta efeito *in vitro* frente à *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* (LUMBRERAS; LIZASOAIN; AGUADO, 2003), *C. posadasii* (CORDEIRO et al., 2006c), *B. dermatitidis* e *H. capsulatum*

(GONZÁLEZ, 2009). No entanto, cepas de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* apresentam resistência a droga (ESPINEL-INGROFF; BOYLE; SHEEHAN, 2001). Os novos azólicos voriconazol, ravuconazol e posaconazol são ativos *in vitro* sobre *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *B. dermatitidis*, *C. immitis* e *H. capsulatum*, incluindo os isolados resistentes a fluconazol e itraconazol (PFALLER et al., 2002; GREER, 2007; GONZÁLEZ, 2009).

Com relação à atividade *in vivo*, o cetoconazol é utilizado no controle de micoses sistêmicas, porém é limitado a casos não graves. O fluconazol possui atividade frente a leveduras dos gêneros *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., bem como *Aspergillus* spp. e outros fungos filamentosos, e os fungos dimórficos *P. brasiliensis* e *Coccidioides* spp. O itraconazol é utilizado no tratamento de aspergilose, esporotricose, cromomicose, assim como micoses superficiais causadas por *Candida* spp. e *Malassezia* spp. (LUMBRERAS; LIZASOAIN; AGUADO, 2003; CAZEDEY et al., 2007).

Atualmente, os agentes triazólicos são considerados uma alternativa aos antifúngicos convencionais para o tratamento de algumas micoses, em virtude um amplo espectro de ação e a ausência de efeitos adversos graves. No entanto, os únicos disponíveis para uso clínico são voriconazol, para o tratamento de aspergilose pulmonar invasiva; e posaconazol, para o tratamento de candidíase orofaríngea e aspergilose invasiva (PAGE; LILES, 2008; KOBAYASHI et al., 2009).

O tratamento com derivados azólicos podem apresentar alguns efeitos adversos que são considerados benignos, como hepatotoxicidade, intolerância gastrintestinal, hipersensibilidade, náuseas, vômitos e diarreia (MARTINEZ, 2006).

Algumas drogas podem interagir sinergicamente com os azólicos, como por exemplo, combinações das drogas anti-tuberculose com os principais derivados triazólicos frente a cepas de *C. posadasii* (MEDRANO, 2010) e *H. capsulatum* (MARQUES, 2009).

1.3.3 Equinocandinas

As equinocandinas são constituídas por um grupo semi-sintético de agentes antifúngicos, que foram isolados, pela primeira vez em 1974, de culturas de *Aspergillus* spp. (GOBERNADO; CANTÓN, 2008). A primeira aprovação comercial pelo FDA deu-se apenas em 2001, com a caspofungina, seguida da micafungina em 2005 e anidulafungina em 2006. Atualmente, as equinocandinas são consideradas um importante grupo de drogas no tratamento da candidíase superficial e invasiva e de aspergiloses (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008).

As equinocandinas 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 sob diferentes formas, dependendo da droga, como: um ácido graxo na caspofungina, um complexo aromático na micafungina, uma cadeia alcoxitrifênilo na anidulafungina (GOBERNADO; CANTÓN, 2008).

O mecanismo de ação destas drogas é caracterizado pela inibição não competitiva e irreversível de (1,3)- β -D-glucano sintase, enzima responsável pela síntese do (1,3)- β -D-glucano, um importante polissacarídeo da parede celular da maioria dos fungos patogênicos, responsável pela rigidez da parede, assim como a integridade osmótica, crescimento e divisão da célula (Figura 10) (CHANDRASEKAR; SOBEL, 2006). Na ausência deste polissacarídeo, as células fúngicas sofrem danos na estrutura e integridade da parede celular, provocando assim a morte do microrganismo (GOBERNADO; CANTÓN, 2008).

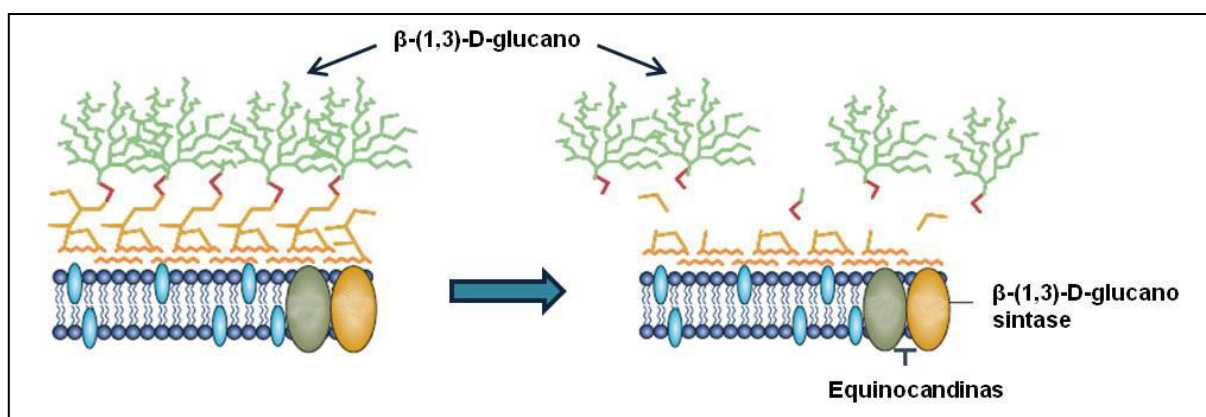


Figura 10. Mecanismo de ação das equinocandinas. Fonte: Figura adaptada de COWEN, 2008.

A parede celular fúngica é constituída por uma camada externa de manoproteínas e uma camada interna composta por quitina, α -glucanos e/ou β -glucanos. Devido à ausência desses componentes nas células dos mamíferos, as equinocandinas apresentam uma baixa toxicidade (CHANDRASEKAR; SOBEL, 2006).

As equinocandinas apresentam atividade fungicida contra *Candida* spp. e efeito fungistático contra *Aspergillus* spp. O espectro de ação da caspofungina inclui também outras espécies fúngicas, tais como: *Scedosporium apiospermum*, *B. dermatitidis*, *Coccidioides* spp. e *H. capsulatum* (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008). No entanto, as equinocandinas não possuem atividade *in vitro* frente à *C. neoformans*, *Trichosporon asahii*, *Rhizopus* spp. e *Fusarium* spp. (CATALÁN; MONTEJO, 2006).

A anidulafungina possui atividade *in vivo* contra vários outros fungos, como *Mucor* spp., *Penicillium marneffeii*, *Exophiala jeanselmei*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora*

verrucosa e *Pseudallescheria boydii*. No entanto, assim como as outras equinocandinas, não possui eficácia no tratamento de infecções causadas por *C. neoformans*, *Trichosporon* spp., *Rhizopus arrhizus*, *Fusarium* spp., *B. dermatitidis* e *H. capsulatum*, devido principalmente ao baixo teor de glucano presente na parede celular desses fungos. A resistência intrínseca do fungo *C. neoformans* a esses fármacos, por exemplo, pode ser explicada devido à presença de apenas α -(1,6) ou α -(1,3)-D-glucano em sua parede celular (PETRIKKOS; SKIADA, 2007; GOBERNADO; CANTÓN, 2008).

A caspofungina e a anidulafungina são empregadas no tratamento de aspergilose invasiva resistente a terapia padrão, candidemia e candidíase esofágica, sendo esta última também tratada com micafungina (CATALÁN; MONTEJO, 2006; PETRIKKOS; SKIADA, 2007). As equinocandinas são bem toleradas, não havendo relatos de efeitos adversos graves, apenas alguns sintomas, como flebites, náuseas, vômitos, diarreia e cefaléia (AZANZA; MONTEJO, 2008).

A associação *in vitro* entre equinocandinas e outras drogas antifúngicas demonstram sinergismo na maioria das vezes, como caspofungina e anfotericina B (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004), e caspofungina com os azólicos itraconazol, voriconazol e posaconazol frente à *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. (ESPINEL-INGROFF, 2003). No entanto, os testes em pacientes com infecções fúngicas ainda encontram-se em fase de estudo, apresentando resultados bastante variáveis que não confirmam um efeito sinérgico considerável para uso clínico (JOHNSON et al., 2004).

1.4 Drogas antimicrobianas com potencial antifúngico

As “drogas não-antifúngicas” constituem um grupo de compostos que são empregados na terapia de doenças de etiologia não-fúngica, mas que apresentam um amplo espectro antifúngico (LACAZ et al., 2002; HANAFY et al., 2007). Dessa maneira, estudos têm sido realizados a fim de avaliar a atividade *in vitro* dessas drogas frente a espécies fúngicas patogênicas, sendo descrito alguns exemplos a seguir.

Sulfametoxazol com trimetropim agem sinergicamente bloqueando enzimas que catalisam estágios sucessivos na biossíntese do ácido fólico (cofator na síntese de purinas, timidina e DNA) no microrganismo (TAVARES, 2007). Esta associação de drogas tem apresentado efeito inibitório *in vitro* (AFELTRA; VERWEIJ, 2003; HAHN et al., 2003) e *in vivo* (VISBAL et al., 2005; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006) frente a cepas de *Paracoccidioides brasiliensis*, sendo atualmente indicada como uma das estratégias terapêuticas no tratamento da paracoccidioidomicose (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Estudos realizados por Medrano (2010) mostraram que a associação de sulfametoxazol e trimetropim possui efeito inibitório sobre cepas de *C. posadasii*, bem como, contribui para o aumento da sensibilidade *in vitro* de *C. posadasii* frente à anfotericina B. Brilhante et al. (2010) também verificaram a ação inibitória de sulfametoxazol com trimetropim frente a cepas de *H. capsulatum*.

As drogas antituberculose, como isoniazida, pirazinamida e etambutol são utilizadas no tratamento de quadros de tuberculose e combinam elevado nível de eficiência e baixa toxicidade, agindo no sistema enzimático das micobactérias ou bloqueando sua síntese protéica (CAMPOS, 2007). Estudos demonstraram que estas drogas apresentam resultados promissores *in vitro* frente às cepas de *C. posadasii* (CORDEIRO et al., 2006b) e cepas de *H. capsulatum* (MARQUES, 2009). Segundo Cordeiro et al. (2006b), o efeito inibitório *in vitro* das drogas antituberculose frente à *C. posadasii* seja provavelmente devido à existência de sítios análogos de ligação a essas drogas presentes na mitocôndria do fungo.

Outros estudos revelaram a capacidade das drogas antituberculose interagirem sinergicamente com agentes antifúngicos, como por exemplo, a associação de rifampicina com anfotericina B frente a biofilmes de espécies de *Candida*, acreditando-se que o efeito sinérgico deva-se a ligações entre AMB e esteróis da membrana celular fúngica, que aumentam sua permeabilidade e permitem a entrada de rifampicina com a subsequente interferência da síntese do RNA da célula fúngica (EL-AZIZI, 2007); bem como, combinações de pirazinamida, etambutol e isoniazida com os triazólicos fluconazol, itraconazol e voriconazol, que apresentaram excelentes resultados *in vitro* frente a cepas de *C. posadasii* (CORDEIRO et al., 2009a; MEDRANO, 2010) e *H. capsulatum* (MARQUES, 2009).

As quinolonas também são um exemplo de drogas antimicrobianas que têm mostrado um potencial antifúngico. Essas drogas possuem a capacidade de inibir a atividade catalítica da DNA girase e topoisomerase IV, enzimas essenciais na replicação e transcrição do DNA bacteriano (Figura 11), sendo o grupo das fluoroquinolonas atualmente o mais utilizado devido a presença do flúor em sua estrutura, o que garantiu um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas, como *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., e Gram-negativas, como enterobactérias e *Pseudomonas* spp. (VAN BAMBEKE et al., 2005).

Pesquisas revelaram que as quinolonas não possuem atividade antifúngica de crescimento inibitório quando utilizadas isoladamente frente a algumas espécies de fungos. Entretanto, este efeito antifúngico pode ser verificado quando as quinolonas são utilizadas em associação com agentes antifúngicos, tornando-se capazes de atuar na topoisomerase II (DNA girase) dos fungos (SHEN; FOSTEL, 1994; FOSTEL; MONTGOMERY; LARTEY, 1996).

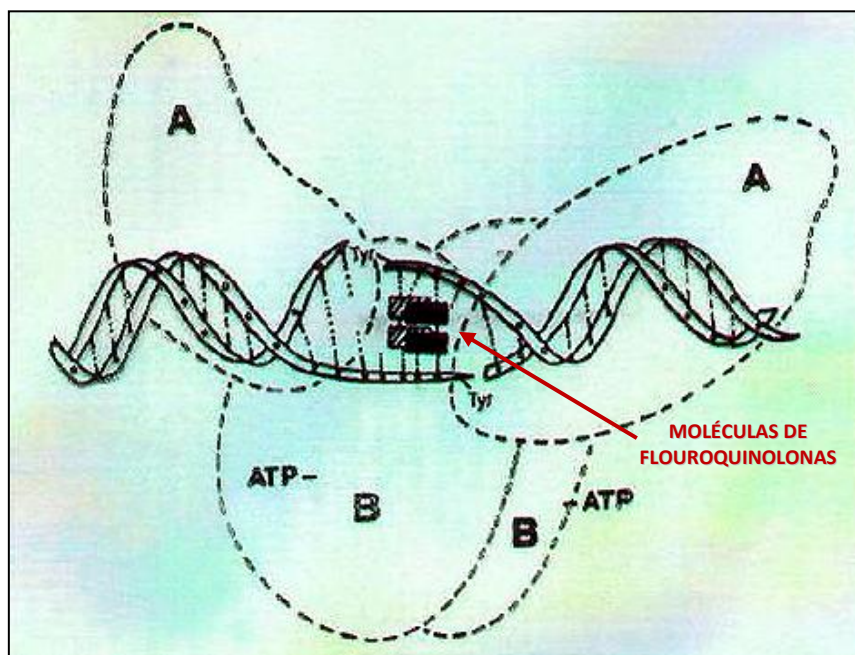


Figura 11. Mecanismo de ação das quinolonas. As duas subunidades A da DNA girase ao clivarem a dupla fita de DNA bacteriano permitem que moléculas de quinolonas interajam com ambas, havendo a quebra da fita de DNA, o que acarreta a não replicação e compactação do DNA e consequente morte celular. Fonte: SHEN, 1993.

A investigação sobre o potencial antifúngico das quinolonas não é recente. A eficácia destas drogas na modulação dos efeitos dos agentes antifúngicos tem sido observada em alguns casos (NAKAJIMA et al., 1995; SUGAR; LIU; CHEN, 1997; SASAKI et al., 2000; TURNER; SAMUEL, 2004).

Dentre as quinolonas, vale destacar a ciprofloxacina (Figura 12), uma fluoroquinolona que possui a capacidade de se ligar a topoisomerase II dos fungos, inibindo a replicação do DNA desses microrganismos (SHEN; FOSTEL, 1994). Estudos têm verificado a presença de interações farmacodinâmicas *in vitro* entre esta droga e agentes antifúngicos frente a espécies fúngicas causadoras de micoses invasivas (STERGIOPOULOU et al., 2008).

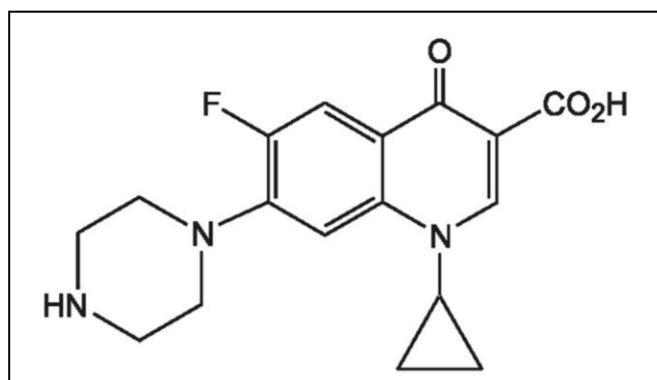


Figura 12. Estrutura química da ciprofloxacina. Fonte: SHEN; FOSTEL, 1994.

Apesar de várias pesquisas relacionadas à avaliação da capacidade antifúngica das quinolonas estarem em andamento, estudos ainda não foram realizados frente a fungos dimórficos. Diante disso, e devido à presença de novos casos de coccidioidomicose e histoplasmosose no Ceará, bem como em outras regiões do Brasil, e a consequente busca por novas drogas para o tratamento dessas micoses sistêmicas, houve um interesse em avaliar pela primeira vez, a atividade inibitória *in vitro* de ciprofloxacina isolada e em combinação com drogas antifúngicas frente a cepas de *C. posadasii* e *H. capsulatum*.

1.5 Métodos de estudo da atividade antifúngica *in vitro*

Durante muito tempo, houve um maior destaque para o desenvolvimento de estudos de sensibilidade a antibacterianos. No entanto, nos últimos anos, devido a dificuldades no tratamento de pacientes imunodeficientes, houve o crescimento do interesse pela busca do perfil de sensibilidade *in vitro* de cepas fúngicas (PEREA et al., 2001). Apesar de uma correlação não muito direta entre sensibilidade *in vitro* com *in vivo*, com o aumento da prevalência das micoses e da variabilidade de drogas para o tratamento destas enfermidades, a padronização de métodos de testes de sensibilidade *in vitro* se faz cada vez mais necessária, a fim de tornar a escolha da terapêutica mais adequada e eficiente (ODDS et al., 1998).

Os testes de sensibilidade de antifúngicos *in vitro* são utilizados para avaliar o seu potencial terapêutico, comprovar a sensibilidade do fungo frente aos antifúngicos e obter informações para o controle da terapia antifúngica, sendo capazes de prever uma resposta clínica ou falha terapêutica para o resultado de um tratamento (REX et al., 2001; HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004). As técnicas adotadas para a análise da atividade de agentes antifúngicos seguem normas de referência padronizadas pelos órgãos internacionais *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004), os quais propõem como principais métodos a disco-difusão, a diluição em ágar e a diluição em caldo. Estes métodos permitem identificar a concentração inibitória mínima (CIM) da droga, capaz de inibir o crescimento do microrganismo em estudo (STOPPA et al., 2009).

O comitê europeu AFST-EUCAST - *Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility* desenvolve metodologias padrão para testes de sensibilidade antifúngica, com a finalidade de alcançar maior reprodutibilidade e exatidão na determinação dos valores de CIM. Algumas das técnicas adotadas baseiam-se em procedimentos do CLSI com algumas modificações, como

suplementação do meio RPMI 1640 com 2% de glicose, utilização de placas com poços com fundo chato, tamanho diferente de inóculo, leituras em espectrofotômetro e inibição de 50% de crescimento fúngico na determinação do CIM (EUCAST, 2010; STOPPA et al., 2009).

O CLSI é uma organização qualificada para a criação de normas de referência que garantem a padronização técnica dos testes de sensibilidade antifúngica, tratando de assuntos como a seleção e preparação dos agentes antifúngicos, a interpretação dos testes, bem como, o uso de testes de controle de qualidade, facilitando assim a comunicação e padronização entre os diversos laboratórios na utilização dessas técnicas (HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) possui os direitos autorais em língua portuguesa do manual do CLSI e suas atualizações. A padronização dos métodos é importante, pois auxiliam na análise significativa dos diversos estudos realizados, a fim de determinar uma correlação entre as Concentrações Inibitórias Mínimas, *in vitro*, e a resposta clínica à terapêutica (STOPPA et al., 2009).

Em 1997, foi aprovado o documento M27-A, destinado a testes de micro e macrodiluição em caldo para avaliar a sensibilidade *in vitro* de leveduras, como *Candida* spp., e *Cryptococcus neoformans*. Em 2002, este documento foi revisto e atualizado para o documento M27-A2 (CLSI, 2002a). Neste mesmo ano, foi publicado o documento M38-A, que se destina à realização de testes de micro e macrodiluição para avaliar a sensibilidade *in vitro* de fungos filamentosos, incluindo espécies de *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*) e *Sporothrix schenckii* (CLSI, 2002b).

Ambos os documentos M27-A2 e M38-A apresentam critérios para a seleção dos agentes antifúngicos, preparação das soluções antifúngicas padrão, uso de RPMI a pH 7,0 como meio de cultivo, confecção do inóculo por espectrofotometria, tempo e temperatura de incubação, leitura visual dos tubos ou placas e determinação dos pontos de corte. Condições de ensaio para anfotericina B, os derivados azólicos cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol, assim como as equinocandinas caspofungina e anidulafungina também estão mencionados nesses documentos (CLSI, 2002a; 2002b).

Embora os testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* ainda não sejam padronizados para fungos dimórficos, os documentos M27-A2 e M38-A têm sido utilizados para testar as formas leveduriformes e as formas filamentosas destes fungos, respectivamente. Tal fato pode ser verificado em alguns estudos, como Nakai et al. (2003), que fizeram uso de testes de microdiluição em caldo descritos no documento M27-A2 para avaliar a sensibilidade de *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii* e *Sporothrix schenckii* nas fases filamentosa e leveduriforme, e

Coccidioides immitis na fase filamentosa, bem como Brilhante et al. (2010), que seguiram o mesmo critério de Nakai et al. (2003), avaliando a sensibilidade de *Histoplasma capsulatum* nas fases filamentosa e leveduriforme, e Cordeiro et al. (2006c), que fizeram uso de testes de macrodiluição em caldo descritos no documento M38-A para avaliar a sensibilidade de *Coccidioides posadasii* na fase filamentosa. No entanto, estes testes incluem modificações verificadas com relação ao tamanho do inóculo, a temperatura e duração de incubação, e o critério de leitura, que variam de acordo com o microrganismo e o teste realizado (NAKAI et al., 2003; CORDEIRO et al., 2006c; BRILHANTE et al., 2010).

Para o estudo da ação combinada de drogas, a concentração inibitória mínima (CIM) de diferentes drogas em associação pode ser determinada através dos seguintes métodos: E-test (do inglês *Epsilometer Strip Test*), método da cinética de morte (do inglês *time-kill*), e método de *Checkerboard*, sendo este último o mais utilizado (ODDS, 2003b).

O método de *Checkerboard* é capaz de determinar a percentagem de inibição do crescimento de células fúngicas na presença da combinação de drogas, sendo calculado em relação ao controle positivo para crescimento fúngico. É um método de fácil execução, sendo utilizadas diferentes diluições dos antimicrobianos em concentrações superiores ou inferiores à CIM de cada um deles perante o microrganismo em estudo (O'SHAUGHNESSY et al., 2006).

O uso deste método muitas vezes é seguido por uma análise mais aprofundada, utilizando o Índice de Concentração Inibitória Fracionária (do inglês *Fractional Inhibitory Concentration Index - FICI*). Dessa maneira, o método de *Checkerboard* é usado para determinar a concentração inibitória fracionada (FIC) de cada combinação de droga testada, definida pela relação entre o CIM da droga usada em combinação e o CIM da mesma droga usada isoladamente, sendo o FICI considerado o somatório dos FICs de cada droga testada (ODDS, 2003b). O cálculo da soma dos FICs segue a equação:

$$\Sigma \text{FIC} = \text{FIC}_{C_1} + \text{FIC}_{C_2} = \frac{C_{C_1}}{\text{CIM}_{C_1}} + \frac{C_{C_2}}{\text{CIM}_{C_2}}$$

Onde, CIM_{C_1} é o CIM da droga 1 testada isoladamente; CIM_{C_2} é o CIM da droga 2 testada isoladamente; C_{C_1} é o CIM da droga 1 testada em combinação; C_{C_2} é o CIM da droga 2 testada em combinação (O'SHAUGHNESSY et al., 2006).

A fim de manter uma uniformização de interpretação, Odds (2003b) propôs uma classificação para a interação das drogas baseada nos seguintes intervalos: $\text{FICI} \leq 0,5$ deve ser considerado como sinérgico; $0,5 < \text{FICI} < 4$ como indiferente; e $\text{FICI} \geq 4$ como antagonismo.

Um resultado sinérgico ocorre quando duas drogas em combinação atuam significativamente melhor do que a resposta de cada uma delas utilizada separadamente. Uma interação de drogas é considerada indiferente quando o resultado das duas em combinação é igual ao obtido apenas com a droga que é mais eficaz. Já o antagonismo é verificado quando o resultado das duas drogas em combinação é significativamente pior do que a resposta de cada uma delas utilizada separadamente (ODDS, 2003b).

Os possíveis benefícios terapêuticos proporcionados por combinações sinérgicas incluem: aumento na eficácia do efeito terapêutico; diminuição da dosagem da droga a fim evitar sua toxicidade; e diminuição ou manutenção do desenvolvimento de resistência aos medicamentos. Desta maneira, o uso de drogas múltiplas com diferentes mecanismos de ação, provavelmente, pode atingir diversos alvos, agindo de modo mais eficaz contra o microrganismo (CHOU, 2006).

2 PERGUNTAS DE PARTIDA

1. Ciprofloxacina utilizada isoladamente apresenta ação inibitória *in vitro* frente a cepas de *C. posadasii* e *H. capsulatum*?

2. O efeito inibitório *in vitro* de ciprofloxacina frente a *C. posadasii* e *H. capsulatum* é potencializado pela combinação com agentes antifúngicos?

3. A associação de ciprofloxacina em baixa concentração com anfotericina B possui maior efeito sinérgico frente às cepas de *C. posadasii* e *H. capsulatum*?

3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

1. Ciprofloxacina inibe o crescimento, *in vitro*, dos fungos dimórficos *C. posadasii* e *H. capsulatum*;

2. O efeito inibitório *in vitro* de ciprofloxacina é potencializado pela combinação com drogas antifúngicas frente *C. posadasii* e *H. capsulatum*; e

3. A interação de ciprofloxacina em baixa concentração com anfotericina B possui maior sinergismo frente a cepas de *C. posadasii* e *H. capsulatum*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a ação inibitória *in vitro* de ciprofloxacina isolada e em combinação com antifúngicos frente a *C. posadasii* e *H. capsulatum*.

4.2 Objetivos específicos

1. Verificar a sensibilidade *in vitro* das cepas de *C. posadasii* e *H. capsulatum* frente à ciprofloxacina utilizada isoladamente;
2. Avaliar a interação *in vitro* de ciprofloxacina com os antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e caspofungina frente a *C. posadasii* e *H. capsulatum*;
3. Avaliar o efeito sinérgico de ciprofloxacina em baixa concentração associada à anfotericina B frente a cepas de *C. posadasii* e *H. capsulatum*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos adotados ao longo da pesquisa foram realizados em cabine de segurança biológica classe II em laboratório de nível de biossegurança 3 (NB-3) do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC) (Figura 13).



Figura 13. **A.** Sala de nível de biossegurança 3 (NB-3); **B.** Cabine de segurança biológica classe II. Fonte: CEMM, 2010.

5.1 Microrganismos

Para a realização deste estudo, foram utilizados 16 cepas de *C. posadasii* e 16 cepas de *H. capsulatum* na fase filamentosa, sendo desta última 9 utilizadas também na fase leveduriforme, todos pertencentes à Micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

As culturas de *C. posadasii* e *H. capsulatum* na fase filamentosa encontravam-se estocadas em ágar batata dextrose (Difco, Detroit, E.U.A.) acrescido de dimetilsulfóxido – DMSO a 10% (Merck, Darmstadt, Alemanha) a -20°C ou solução salina estéril a 4°C, sendo previamente identificadas por meio de análise microscópica direta e cultura, e por técnicas imunológicas e moleculares. As cepas retiradas do estoque foram recuperadas mediante semeadura em ágar batata, as quais foram submetidas à análise macroscópica, levando-se em consideração relevo, textura e pigmentação das colônias após 7-10 dias de incubação a 25-28°C (Figuras 14A e 15A), e análise microscópica, através da observação, em microscópio óptico, de fragmentos das colônias com no mínimo 7 dias de incubação, montados entre lâmina e lamínula com lactofenol azul-algodão. As culturas foram consideradas positivas para *C. posadasii* pela presença de hifas hialinas finas e artroconídios intercalados por células disjuntoras (Figura 14B), e para *H. capsulatum* pela presença de hifas hialinas finas e macroconídios tuberculados (Figura 15B).

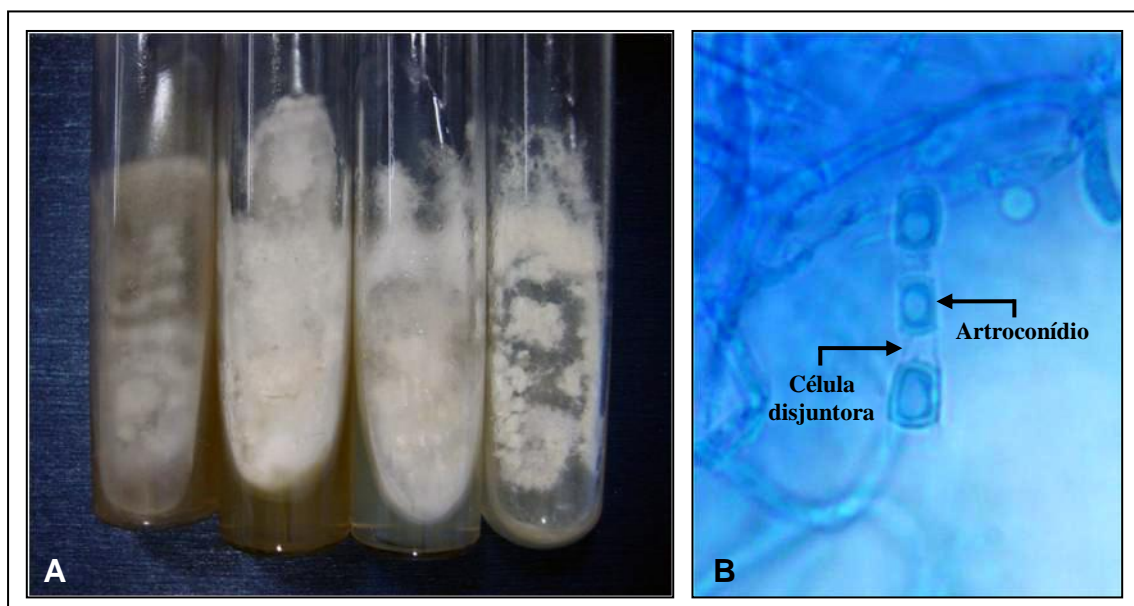


Figura 14. *Coccidioides posadasii* na fase filamentosa. **A.** Macromorfologia, mostrando colônias algodonosas brancas; **B.** Micromorfologia, mostrando hifas e artroconídios intercalados por células disjuntoras. Fonte: CEMM, 2010.

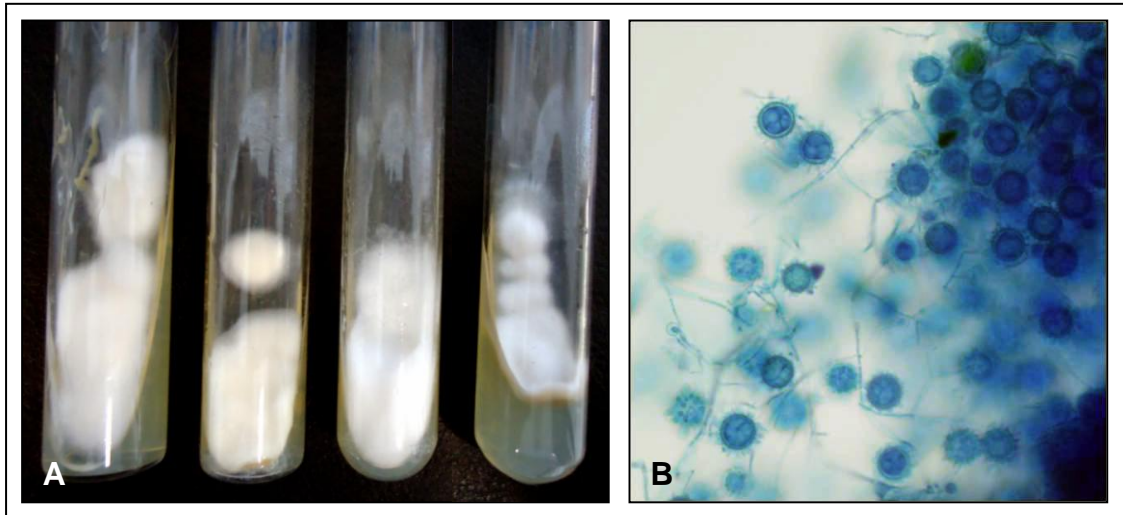


Figura 15. *Histoplasma capsulatum* na fase filamentosa. **A.** Macromorfologia, mostrando colônias algodonosas brancas; **B.** Micromorfologia, mostrando hifas e macroconídios tuberculados. Fonte: CEMM, 2010.

Para a obtenção de culturas de *H. capsulatum* na fase leveduriforme, a conversão fúngica foi realizada através do cultivo de culturas na fase filamentosa em ágar Sabouraud ou ágar BHI com sangue de carneiro a 10%, incubadas a 35 °C e mantidas por repiques semanais, com posterior análise de sua macromorfologia e micromorfologia (Figura 16).

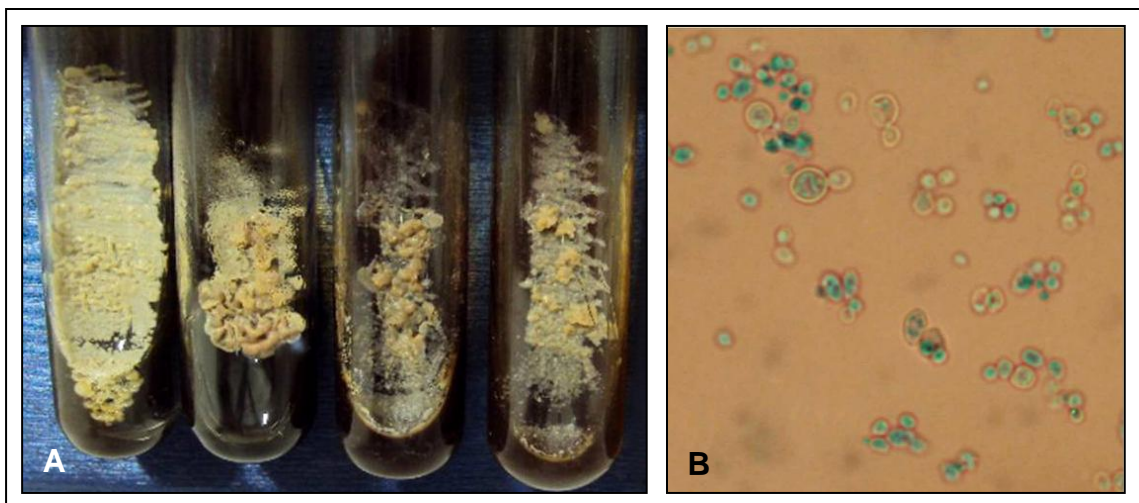


Figura 16. *Histoplasma capsulatum* na fase leveduriforme. **A.** Macromorfologia, mostrando colônias cremosas, úmidas e lisas; **B.** Micromorfologia, mostrando células ovais uninucleadas. Fonte: CEMM, 2010.

Os isolados clínicos de *C. posadasii* são provenientes de amostras como lavado brônquico, escarro (Figura 17) ou fluido pericárdico, coletadas em cidades do Nordeste brasileiro e os isolados de origem ambiental são procedentes de amostras de solo coletadas no município de Solonópoles, Ceará, descritos no Quadro 1. Todos os isolados clínicos de *H.*

capsulatum são provenientes de amostras como aspirado de medula óssea ou creme leucocitário (Figura 18), coletadas no Hospital São José, Fortaleza, Ceará, descritos no Quadro 2.

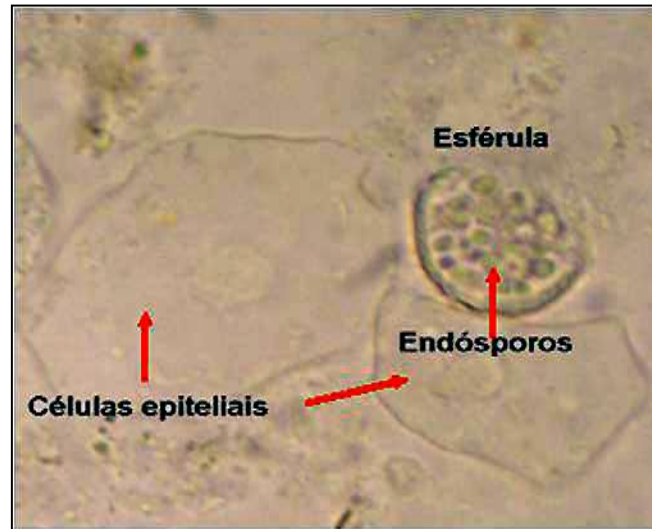


Figura 17. Exame direto de escarro em preparação com KOH 30%, mostrando uma esférula de *C. posadasii* repleta de endósporos. Fonte: CORDEIRO, 2006.

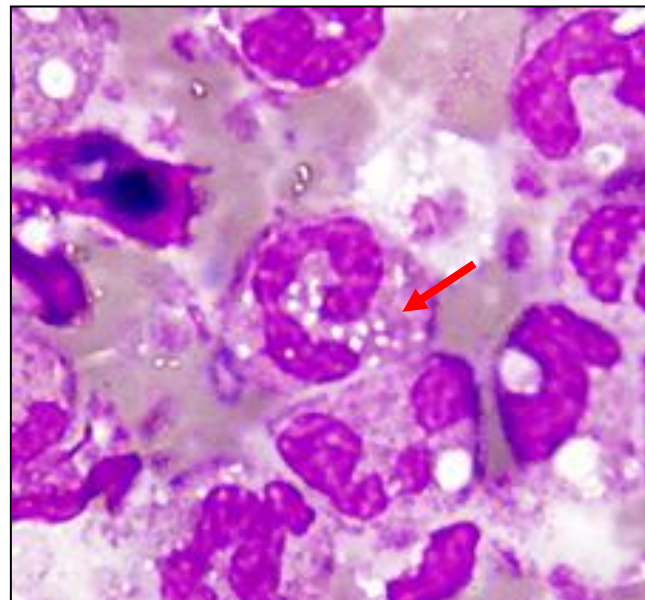


Figura 18. Leucócitos corados com Giemsa, mostrando células leveduriformes intracelulares de *H. capsulatum*. Fonte: CEMM, 2010.

Quadro 1. Relação dos isolados clínicos e ambientais de *Coccidioides posadasii* utilizados na pesquisa.

Número	Isolados	Origem	Ano de isolamento	Localidade
1	CEMM 01-6-085	Lavado brônquico	2003	Santa Quitéria
2	CEMM 01-6-089	Lavado brônquico	2001	Solonópoles
3	CEMM 01-6-090	Solo (toca de tatu)	2004	Solonópoles
4	CEMM 01-6-091	Solo (toca de tatu)	2004	Solonópoles
5	CEMM 01-6-092	Solo (toca de tatu)	2004	Solonópoles
6	CEMM 01-6-101	Lavado brônquico	2004	Solonópoles
7	CEMM 01-6-102	Lavado brônquico	2004	Arneiroz
8	CEMM 01-6-103	Escarro	1995	Aiuaba
9	CEMM 05-2-063	Fluido pericárdico	2005	Ibiapina
10	CEMM 05-2-064	Lavado brônquico	2006	Sobral
11	CEMM 05-2-065	Lavado brônquico	2006	Sobral
12	CEMM 05-2-066	Lavado brônquico	2006	Sobral
13	CEMM 05-2-067	Lavado brônquico	2007	Jaguaribe
14	CEMM 05-2-068	Lavado brônquico	2007	Jaguaribe
15	CEMM 05-2-069	Lavado brônquico	2006	Piauí
16	CEMM 05-2-070	Escarro	2007	Parambu

Quadro 2. Relação dos isolados clínicos de *Histoplasma capsulatum* utilizados na pesquisa.

Número	Isolados	Origem	Ano de isolamento	Localidade
1	CEMM 03-2-088	Creme leucocitário	2007	Fortaleza
2	CEMM 03-2-090	Creme leucocitário	2007	Fortaleza
3	CEMM 03-3-003	Creme leucocitário	2007	Fortaleza
4	CEMM 03-3-026	Creme leucocitário	2007	Fortaleza
5	CEMM 03-3-033	Creme leucocitário	2007	Fortaleza
6	CEMM 03-3-034	Creme leucocitário	2007	Fortaleza
7	CEMM 03-3-036	Aspirado de medula	2007	Fortaleza
8	CEMM 03-3-037	Creme leucocitário	2007	Fortaleza
9	CEMM 03-3-038	Creme leucocitário	2007	Fortaleza
10	CEMM 03-3-039	Creme leucocitário	2007	Fortaleza
11	CEMM 03-3-040	Aspirado de medula	2008	Fortaleza
12	CEMM 03-3-053	Creme leucocitário	2008	Fortaleza
13	CEMM 03-3-054	Creme leucocitário	2008	Fortaleza
14	CEMM 03-4-058	Creme leucocitário	2007	Fortaleza
15	CEMM 03-5-047	Creme leucocitário	2008	Fortaleza
16	CEMM 03-5-061	Aspirado de medula	2008	Fortaleza

5.2 Agentes antimicrobianos

Para a realização dos testes de sensibilidade, foi utilizada a droga antibacteriana ciprofloxacina – CIP (Fresenius Kabi, Brazil) em solução injetável de 2 mg/mL, em sistema fechado com 100 mL, acondicionado em frasco transparente e flexível a 25-28°C.

Foram utilizados quatro agentes antifúngicos: anfotericina B – AMB (Sigma Chemical Corporation, E.U.A.), itraconazol – ITC (Janssen Pharmaceutica, Bélgica), voriconazol – VRC (Pfizer Pharmaceuticals, E.U.A.) e caspofungina – CAS (Merck Sharp & Dohme, Brasil). Para o preparo de soluções-estoque, os fármacos AMB, ITC e VRC foram preparados em DMSO a 100%, enquanto CAS foi dissolvida em água destilada estéril. O material foi homogeneizado em agitador magnético até completa dissolução da droga e, em seguida, transferido para microtubos estéreis. Posteriormente, todas as soluções foram diluídas em RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (Sigma), tamponado a pH 7.0 com ácido 3-[N-morfolino]-propanosulfônico – MOPS 0,165 M (Sigma) e estocadas a -20°C até o momento do uso.

A solução de cada droga isolada utilizada em ensaio de macrodiluição encerrava concentração 20 vezes maior que a concentração empregada no primeiro tubo da série e 40 vezes maior para as drogas testadas em combinação. A solução de cada droga isolada utilizada em ensaio de microdiluição encerrava concentração 4 vezes maior que a concentração empregada no primeiro poço da série e 8 vezes maior para as drogas testadas em combinação.

5.3 Preparo do inóculo para teste de sensibilidade

Para a confecção do inóculo fúngico, as cepas de *C. posadasii* foram repicadas em ágar batata e incubadas por 7 dias a 35°C. O procedimento seguiu através da adição de 1 mL de solução salina 0,9% estéril na cultura fúngica e realização de leves raspagens na superfície do micélio com o auxílio de *swabs*, a fim de obter uma suspensão livre de fragmentos de meio de cultura. A suspensão foi transferida para um tubo de ensaio estéril contendo 4 mL de solução salina 0,9%, submetida a homogeneização manual e deixada em repouso por 5 minutos, a fim de permitir a precipitação de grandes fragmentos da colônia. Posteriormente, a suspensão foi submetida à leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 530 nm e transmitância ajustada para 95%, sendo diluídas na proporção de 1:10 em meio RPMI 1640 para obtenção de uma concentração final de 1×10^3 a 5×10^3 UFC mL⁻¹ (CORDEIRO et al., 2006c).

As cepas de *H. capsulatum* na fase filamentosa foram repicadas em ágar infusão de cérebro-coração – BHI (Himedia, Índia) e incubadas por 7 dias a 25-28°C para posterior realização do inóculo, que seguiu o mesmo procedimento descrito anteriormente.

O preparo do inóculo para as cepas de *H. capsulatum* na fase leveduriforme deu-se através da transferência de uma pequena quantidade da colônia fúngica para 4 mL de solução salina 0,9% com o auxílio de uma alça microbiológica, sendo levadas ao agitador magnético por 10 segundos. As suspensões de *H. capsulatum* (de ambas as fases) foram então submetidas à leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 530 nm e transmitância ajustada para 95%, sendo diluídas na proporção de 1:10 em meio RPMI 1640 para obtenção de uma concentração final de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ (BRILHANTE et al., 2010).

5.4 Ensaio de macrodiluição e microdiluição *in vitro*

Todas as cepas foram testadas frente a drogas isoladas para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Para as cepas de *C. posadasii*, foi utilizado o método de macrodiluição em caldo, descrito no documento M38-A padronizado pelo CLSI (CLSI, 2002b), e utilizado por Cordeiro et al. (2006c). Para o ensaio de macrodiluição, foi utilizada uma série de 5 tubos de ensaio estéreis com tampa (capacidade de 5 mL, 12 × 75 mm), contendo 0,1 mL de meio RPMI 1640. Foi adicionado 0,1 mL de droga no primeiro tubo, a partir do qual a droga foi diluída de forma seriada até o último tubo. As concentrações das drogas testadas variaram conforme apresentado no Quadro 3. Posteriormente, foram adicionados em cada tubo 0,9 mL do inóculo fúngico previamente preparado. Como controle de crescimento da cepa foram utilizados tubos livres da droga contendo 0,1 mL de RPMI 1640 e 0,9 mL de inóculo fúngico. Os procedimentos foram realizados em duplicata. Após 48h de incubação a 35°C, foi realizada leitura visual dos resultados para a determinação das CIMs (CORDEIRO et al., 2006c).

Para as cepas de *H. capsulatum* (de ambas as fases) foi utilizado o método de microdiluição em caldo, descrito no documento M27-A2 padronizado pelo CLSI (CLSI, 2002a), e utilizado por Brilhante et al. (2010). Para o ensaio de microdiluição, foi utilizada uma placa plástica estéril de microtitulação contendo 96 poços com fundo arredondado em forma de U. Com o auxílio de um pipetador automático, foi distribuído em cada um dos micropoços 0,1 mL do meio RPMI 1640. Em seguida, 0,1 mL de droga foi adicionado nos primeiros poços, a partir dos quais a droga foi diluída de forma seriada até os poços da décima

coluna. As concentrações das drogas testadas variaram conforme apresentado no Quadro 3. Por fim, 0,1 mL do inóculo fúngico foi distribuído em cada poço. Controles positivos de crescimento e esterilidade foram incluídos para cada observação testada. Os procedimentos foram realizados em duplicata. A leitura visual dos resultados para a determinação das CIMs foi realizada após 4 dias (para *H. capsulatum* na fase leveduriforme) e 7 dias (para *H. capsulatum* na fase filamentosa) de incubação a 35°C (BRILHANTE et al., 2010).

Quadro 3. Intervalos das concentrações de ciprofloxacina e das drogas antifúngicas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) testadas isoladamente frente a cepas de *C. posadasii* e *H. capsulatum* (de ambas as fases).

Droga	Intervalo de concentração de drogas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	<i>C. posadasii</i>	<i>H. capsulatum</i> (de ambas as fases)
CIP	6,25 – 100	0,975 – 500
AMB	0,0312 – 0,5	0,00195 – 1,0
ITC	0,0312 – 0,5	0,00012 – 0,0625
VRC	0,0312 – 0,5	0,00195 – 1,0
CAS	8 – 128	0,0625 – 32

A concentração inibitória mínima (CIM) das drogas itraconazol, voriconazol, caspofungina e ciprofloxacina foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir 80% do crescimento fúngico visível, quando comparado àquele do tubo-controle livre da droga. A concentração inibitória mínima da anfotericina B foi tida como a menor concentração capaz de impedir 100% do crescimento fúngico (Figura 19) (BRILHANTE et al., 2010; CORDEIRO et al., 2009a).

Para a realização do controle de qualidade para ciprofloxacina, foram utilizadas as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922, como recomendado pelo CLSI, documento M100-S20 (CLSI, 2010). Com relação ao controle de qualidade para as drogas antifúngicas, foram utilizadas as cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258, de acordo com o CLSI, documento M27-A2 (CLSI, 2002a).

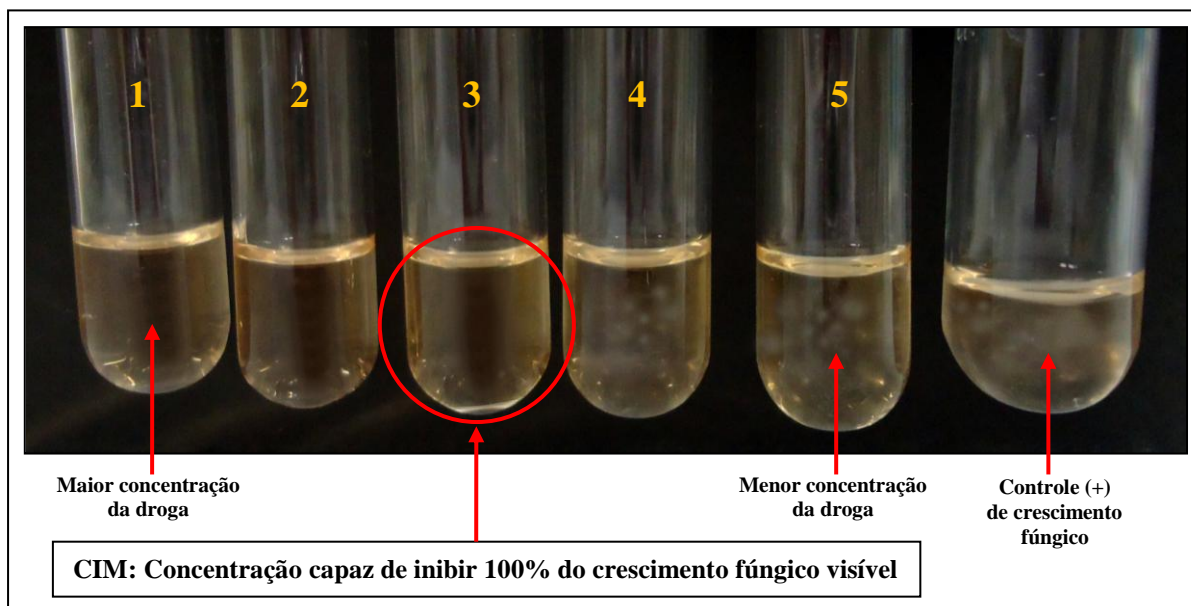


Figura 19. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de anfotericina B frente a cepas de *C. posadasii*. Fonte: CEMM, 2010.

5.5 Ensaio de combinação de drogas *in vitro*

Após a determinação do efeito inibitório das drogas isoladas, foi avaliada a atividade antifúngica de quatro combinações: ciprofloxacina e anfotericina B; ciprofloxacina e itraconazol; ciprofloxacina e voriconazol; ciprofloxacina e caspofungina. Para a realização dos testes de sensibilidade, foi seguido o mesmo procedimento descrito anteriormente.

Os valores de CIM de cada droga isolada foram utilizados como a maior concentração para o preparo das drogas em combinação. As concentrações das drogas testadas em combinação variaram conforme apresentado no Quadro 4. A concentração inibitória mínima (CIM) das drogas antimicrobianas em combinação foi definida como a menor concentração da associação de drogas capaz de inibir 80% do crescimento fúngico visível, quando comparado àquele do tubo-controle livre da droga (Figura 20).

A avaliação da interação entre as drogas foi realizada a partir da determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI) (ODDS, 2003b). O FICI é definido pela soma dos índices de Concentração Inibitória Fracionada (FIC) para cada droga, que corresponde à relação entre o CIM de cada droga utilizada em combinação e o CIM da mesma droga testada isoladamente, sendo, desta forma, considerados os parâmetros descritos no Quadro 5.

Quadro 4. Intervalos das concentrações de ciprofloxacina e das drogas antifúngicas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) testadas em combinação frente a cepas de *C. posadasii* e *H. capsulatum* (de ambas as fases).

Droga	Intervalo de concentração de drogas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	<i>C. posadasii</i>	<i>H. capsulatum</i> (fase filamentosa)	<i>H. capsulatum</i> (fase leveduriforme)
CIP	3,125 – 50	0,488 – 250	0,122 – 250
AMB	0,0039 – 0,125	0,000015 – 0,5	0,00003 – 0,5
ITC	0,0078 – 0,5	0,0000075 – 0,0312	0,0000075 – 0,0312
VRC	0,0078 – 0,25	0,00012 – 0,5	0,0000038 – 0,0312
CAS	1 – 32	0,00048 – 8	0,00097 – 2

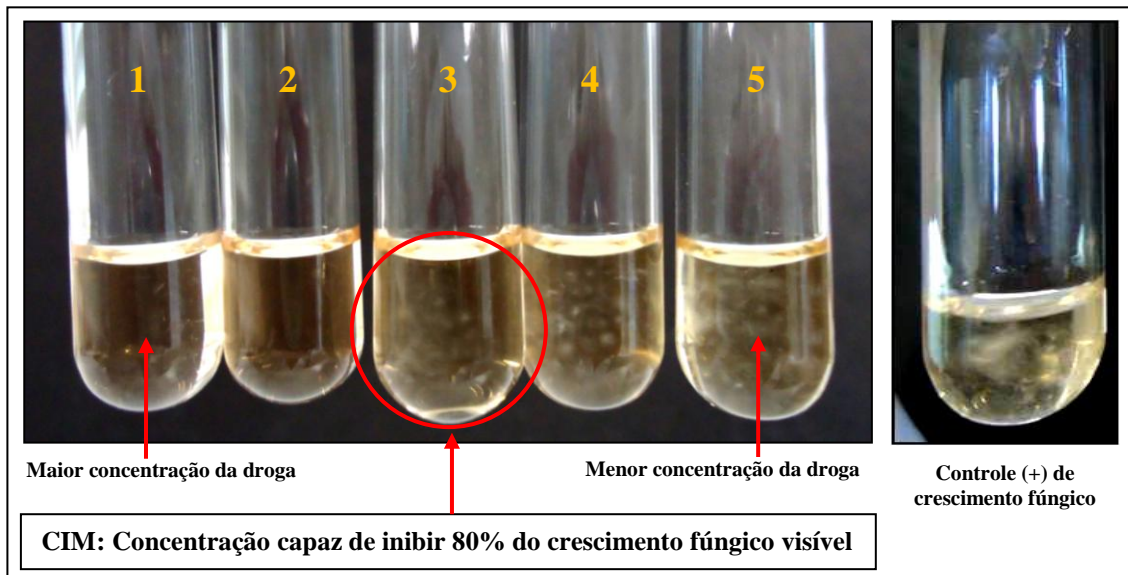


Figura 20. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da associação de ciprofloxacina com itraconazol frente a cepas de *C. posadasii*. Fonte: CEMM, 2010.

Quadro 5. Determinação do FICI e parâmetros para análise dos dados.

Cálculo do FICI	Parâmetros	
FIC A + FIC B	$\text{FICI} \leq 0,5$	Sinergismo
$\text{FIC A} = \frac{\text{CIM A em combinação}}{\text{CIM A isolada}}$	$0,5 < \text{FICI} < 4,0$	Indiferente
$\text{FIC B} = \frac{\text{CIM B em combinação}}{\text{CIM B isolada}}$	$\text{FICI} \geq 4,0$	Antagonismo

5.6 Teste de ciprofloxacina em baixa concentração associada à anfotericina B

A fim de corroborar com os estudos realizados por Stergiopoulou et al. (2008), que demonstraram a interação dose-dependente entre anfotericina B e ciprofloxacina frente a *C. albicans* e *A. fumigatus*, apresentando sinergismo em baixas concentrações de ciprofloxacina e antagonismo em concentrações mais elevadas, foi então realizado um teste para avaliar o efeito sinérgico de ciprofloxacina em baixa concentração associada a anfotericina B frente a cepas de *C. posadasii* e *H. capsulatum* (fase filamentosa). Foram utilizadas concentrações menores de ciprofloxacina, obedecendo aos intervalos descritos no Quadro 6 a seguir. Os intervalos de concentração de AMB foram os mesmos utilizados anteriormente.

Quadro 6. Intervalos das concentrações reduzidas de ciprofloxacina e concentrações de anfotericina B ($\mu\text{g mL}^{-1}$) testadas em combinação frente a cepas de *C. posadasii* e *H. capsulatum* (fase filamentosa).

Droga	Intervalo de concentração de drogas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	<i>C. posadasii</i>	<i>H. capsulatum</i> (fase filamentosa)
CIP	0,625 a 10	0,195 a 100
AMB	0,0039 - 0,125	0,000015 - 0,5

5.7 Análise estatística

O estudo foi realizado utilizando análise de variáveis descritivas. O teste de Wilcoxon foi utilizado para análise de combinações sinérgicas. Os resultados foram expressos como a média e um P-valor $< 0,05$ foi considerado significativo.

6 RESULTADOS

6.1 Teste de sensibilidade de drogas isoladas

A droga ciprofloxacina não foi capaz de inibir o crescimento de *C. posadasii* e *H. capsulatum* (fase filamentosa) nos intervalos de concentrações testados. Dessa maneira, as maiores concentrações de ciprofloxacina testadas frente às respectivas cepas foram consideradas como CIMs para uso posterior no preparo dos testes das drogas em combinação, sendo $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. posadasii* e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *H. capsulatum* (fase filamentosa). No entanto, ciprofloxacina foi capaz de inibir 8 cepas de *H. capsulatum* (fase leveduriforme), apresentando CIMs no intervalo de 62,5 a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os valores de CIM das drogas antifúngicas frente a cepas de *C. posadasii* e *H. capsulatum* apresentados neste trabalho basearam-se em resultados obtidos em experimentos anteriores do Centro Especializado em Micologia Médica. Todas as cepas avaliadas foram sensíveis aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e caspofungina.

Para as cepas de *C. posadasii*, os valores de CIM variaram de 0,0625 - $0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ (média geométrica $0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$) para AMB; 0,125 - $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (média geométrica $0,15 \mu\text{g mL}^{-1}$) para ITC; 0,125 - $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (média geométrica $0,14 \mu\text{g mL}^{-1}$) para VRC e 16 - $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ (média geométrica $28,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) para CAS.

Com relação às cepas de *H. capsulatum* (fase filamentosa), os valores de CIM variaram de 0,0078 - $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (média geométrica $0,16 \mu\text{g mL}^{-1}$) para AMB; 0,0039 - $0,0312 \mu\text{g mL}^{-1}$ (média geométrica $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$) para ITC; 0,0625 - $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (média geométrica $0,21 \mu\text{g mL}^{-1}$) para VRC e 0,25 - $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (média geométrica $2,70 \mu\text{g mL}^{-1}$) para CAS.

No tocante às cepas de *H. capsulatum* (fase leveduriforme), os valores de CIM variaram de 0,0625 - $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (média geométrica $0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$) para AMB; 0,0039 - $0,0312 \mu\text{g mL}^{-1}$ (média geométrica $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$) para ITC; 0,00195 - $0,0312 \mu\text{g mL}^{-1}$ (média geométrica $0,006 \mu\text{g mL}^{-1}$) para VRC e 0,5 - $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (média geométrica $1,36 \mu\text{g mL}^{-1}$) para CAS. Todos os dados estão apresentados na Tabela 1.

Com relação ao controle de qualidade das drogas antifúngicas, foram determinadas as CIMs para *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (AMB: $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; ITC: $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; VRC: $0,0312 \mu\text{g mL}^{-1}$; CAS: $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *Candida krusei* ATCC 6258 (AMB: $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; ITC: $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; VRC: $0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$; CAS: $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$). Quanto ao controle de qualidade de ciprofloxacina, foram verificadas as CIMs para *Staphylococcus aureus* ATCC

29213 (CIP: 0,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (CIP: 0,004 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Todos estes resultados obedeceram aos limites recomendados pelo CLSI, conforme observado na Tabela 2.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) de ciprofloxacina e das drogas antifúngicas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) testadas isoladamente frente a cepas de *C. posadasii* e *H. capsulatum* (de ambas as fases).

Drogas	CIM das drogas isoladas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) frente às cepas					
	<i>C. posadasii</i>		<i>H. capsulatum</i> (fase filamentosa)		<i>H. capsulatum</i> (fase leveduriforme)	
	Intervalo	MG	Intervalo	MG	Intervalo	MG
CIP	100	100	500	500	62,5 - 500	198,42
AMB	0,0625 - 0,125	0,10	0,0078 - 0,5	0,16	0,0625 - 0,5	0,11
ITC	0,125 - 0,5	0,15	0,0039 - 0,0312	0,01	0,0039 - 0,0312	0,01
VRC	0,125 - 0,25	0,14	0,0625 - 0,5	0,21	0,00195 - 0,0312	0,006
CAS	16 - 32	28,1	0,25 - 8	2,70	0,5 - 2	1,36

Legenda: MG = Média Geométrica.

Tabela 2. Controle de qualidade de ciprofloxacina e das drogas antifúngicas.

Cepas	CIM de drogas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	CIP	AMB	ITC	VRC	CAS
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0,12	NT	NT	NT	NT
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,004	NT	NT	NT	NT
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	NT	1	0,5	0,0312	0,5
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	NT	1	0,5	0,125	0,25

Legenda: NT = Não testado.

6.2 Teste de sensibilidade de drogas em combinação

Quanto às combinações formadas por ciprofloxacina e os agentes antifúngicos, observou-se que todas foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *C. posadasii* e *H. capsulatum* (de ambas as fases), sendo detectado efeito sinérgico em parte das cepas para as quatro combinações de drogas, não sendo observado antagonismo em nenhuma delas.

De acordo com os resultados obtidos para as 16 cepas de *C. posadasii*, foram observadas 14 interações sinérgicas para a combinação de ciprofloxacina com caspofungina (FICI: 0,0937 a 0,375), 13 interações sinérgicas para as combinações de ciprofloxacina com itraconazol (FICI: 0,0937 a 0,375) e ciprofloxacina com voriconazol (FICI: 0,0937 a 0,375), e apenas 3 interações sinérgicas para ciprofloxacina com anfotericina B (FICI: 0,375). As demais interações mostraram-se indiferentes, com valores de FICI variando de 0,75 a 1,5. Estes dados podem ser observados na Figura 21. A associação de ciprofloxacina com anfotericina B apresentou valores de FICI significativamente maiores que as associações de ciprofloxacina com itraconazol ($p=0,0088$), voriconazol ($p=0,0014$) e caspofungina ($p=0,0073$). Estatisticamente, não foi encontrada diferença significativa entre as três últimas combinações citadas. As cepas foram inibidas nas seguintes concentrações e médias geométricas, respectivamente: ciprofloxacina (12,5 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 29,73 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com anfotericina B (0,0312 a 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,0652 $\mu\text{g mL}^{-1}$); ciprofloxacina (3,125 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 11,97 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com itraconazol (0,0078 a 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,0371 $\mu\text{g mL}^{-1}$); ciprofloxacina (3,125 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 10,977 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com voriconazol (0,0078 a 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,0312 $\mu\text{g mL}^{-1}$); ciprofloxacina (3,125 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 10,511 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com caspofungina (2 a 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 5,907 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 22).

Conforme os resultados alcançados para as 16 cepas de *H. capsulatum* (fase filamentosa), foi verificado sinergismo para todas as cepas frente à combinação de ciprofloxacina com voriconazol (FICI: 0,1875 a 0,5), bem como 14 interações sinérgicas para ciprofloxacina com itraconazol (FICI: 0,0232 a 0,375), 9 interações sinérgicas para ciprofloxacina com caspofungina (FICI: 0,0117 a 0,375), e apenas 6 interações sinérgicas para ciprofloxacina com anfotericina B (FICI: 0,1875 a 0,375). As demais interações mostraram-se indiferentes, com valores de FICI variando de 0,625 a 1,5. Estes dados podem ser observados na Figura 23. A associação de ciprofloxacina com anfotericina B apresentou valores de FICI significativamente maiores que as associações de ciprofloxacina com itraconazol ($p=0,0073$), voriconazol ($p=0,0051$) e caspofungina ($p=0,0458$). Estatisticamente, não foi encontrada diferença significativa entre as três últimas combinações citadas. As cepas

foram inibidas nas seguintes concentrações e médias geométricas, respectivamente: ciprofloxacina (31,25 a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 96,388 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com anfotericina B (0,0078 a 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,0652 $\mu\text{g mL}^{-1}$); ciprofloxacina (3,906 a 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 52,556 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com itraconazol (0,00006 a 0,0156 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,00275 $\mu\text{g mL}^{-1}$); ciprofloxacina (31,25 a 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 54,883 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com voriconazol (0,0156 a 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,0423 $\mu\text{g mL}^{-1}$); ciprofloxacina (1,95 a 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 52,551 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com caspofungina (0,0312 a 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,5693 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 24).

Segundo os resultados obtidos para as 9 cepas de *H. capsulatum* (fase leveduriforme), foram observadas 4 interações sinérgicas para a combinação de ciprofloxacina com caspofungina (FICI: 0,375 a 0,5), 3 interações sinérgicas para ciprofloxacina com itraconazol (FICI: 0,5), e apenas 1 interação sinérgica para as combinações de ciprofloxacina com voriconazol (FICI: 0,5) e ciprofloxacina com anfotericina B (FICI: 0,5). As demais interações mostraram-se indiferentes, com valores de FICI variando de 0,75 a 2. Estes dados podem ser observados na Figura 25. As cepas foram inibidas nas seguintes concentrações e médias geométricas, respectivamente: ciprofloxacina (31,25 a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 107,155 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com anfotericina B (0,0625 a 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,0674 $\mu\text{g mL}^{-1}$); ciprofloxacina (31,25 a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 78,745 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com itraconazol (0,0039 a 0,0156 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,0066 $\mu\text{g mL}^{-1}$); ciprofloxacina (62,5 a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 135,0074 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com voriconazol (0,00195 a 0,0312 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,0049 $\mu\text{g mL}^{-1}$); ciprofloxacina (31,25 a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 85,0493 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com caspofungina (0,25 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,629 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 26).

Todos os valores de CIM e o índice da concentração inibitória fracionária (FICI) para cada cepa nas quatro combinações avaliadas podem ser visualizados no Anexo I.

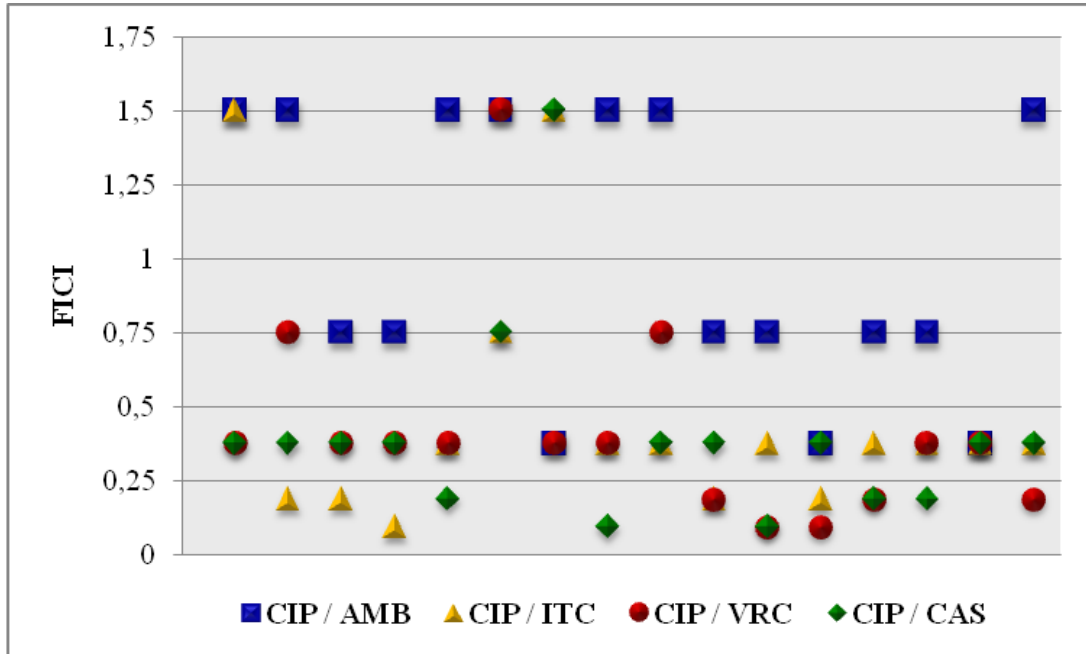


Figura 21. Índice da concentração inibitória fracionária (FICI) da droga ciprofloxacina em combinação com os antifúngicos frente às 16 cepas de *C. posadasii*.

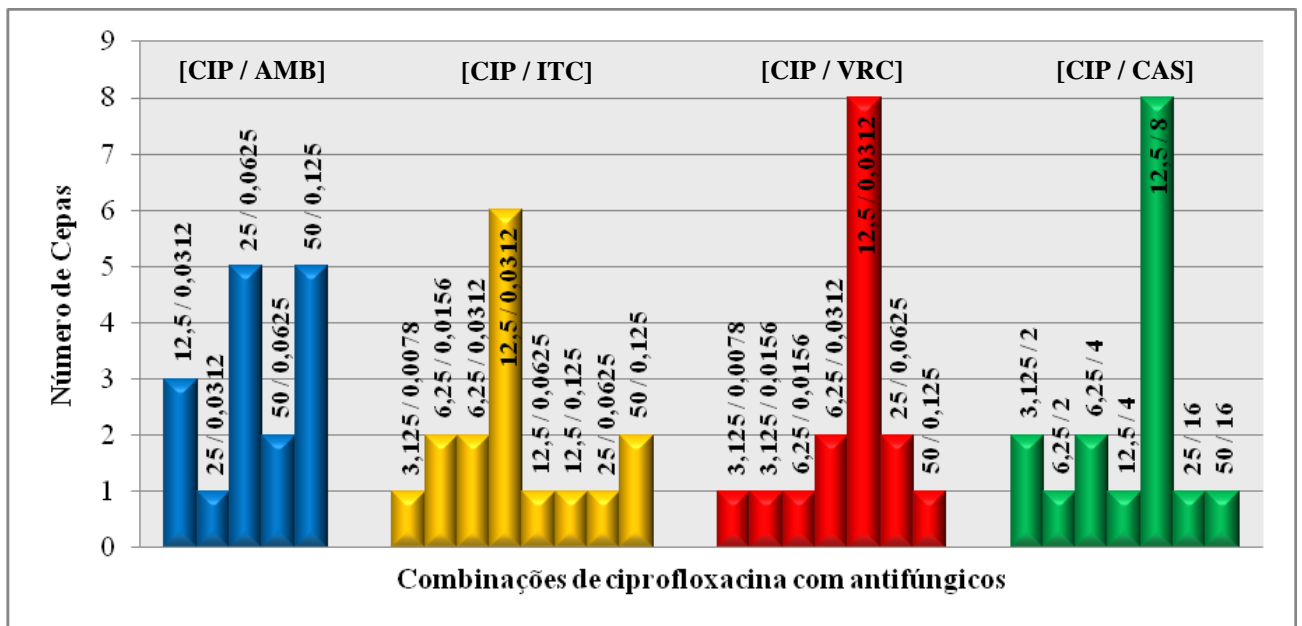


Figura 22. Concentração inibitória mínima (CIM) da droga ciprofloxacina em combinação com os antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e caspofungina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) frente às 16 cepas de *C. posadasii*.

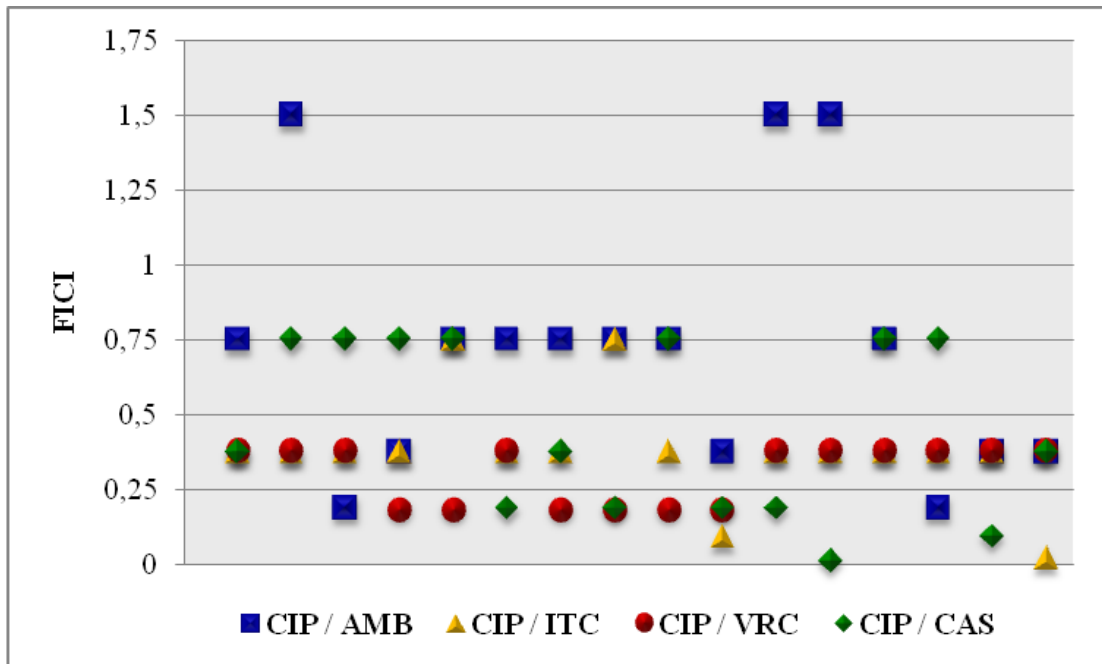


Figura 23. Índice da concentração inibitória fracionária (FICI) da droga ciprofloxacina em combinação com os antifúngicos frente às 16 cepas de *H. capsulatum* (fase filamentosa).

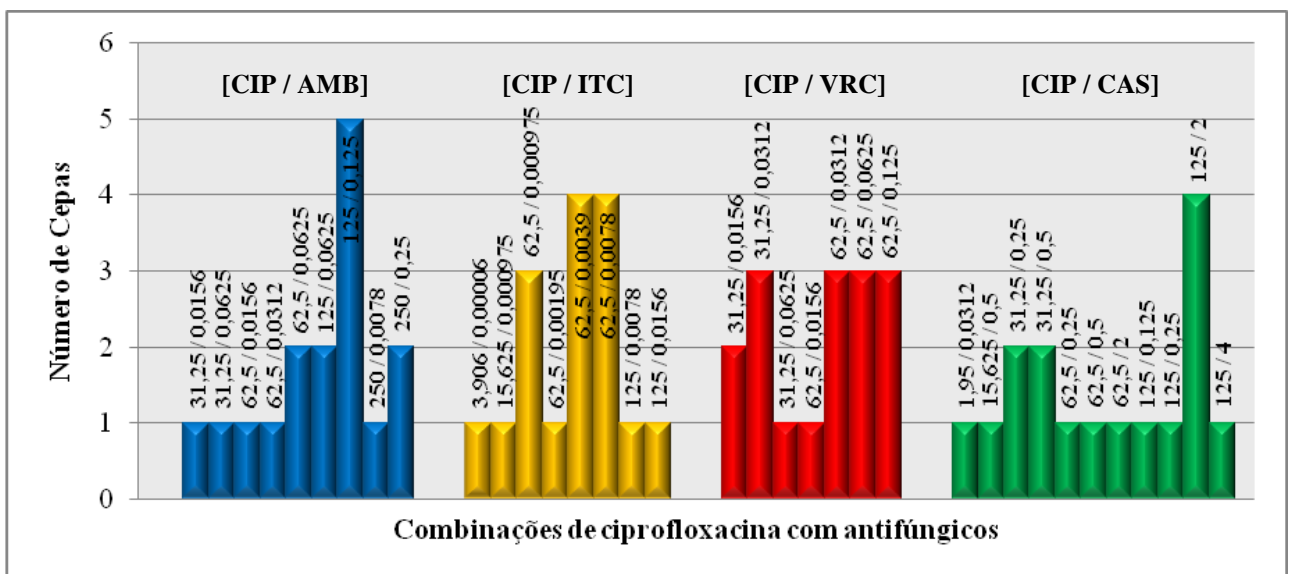


Figura 24. Concentração inibitória mínima (CIM) da droga ciprofloxacina em combinação com os antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e caspofungina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) frente às 16 cepas de *H. capsulatum* (fase filamentosa).

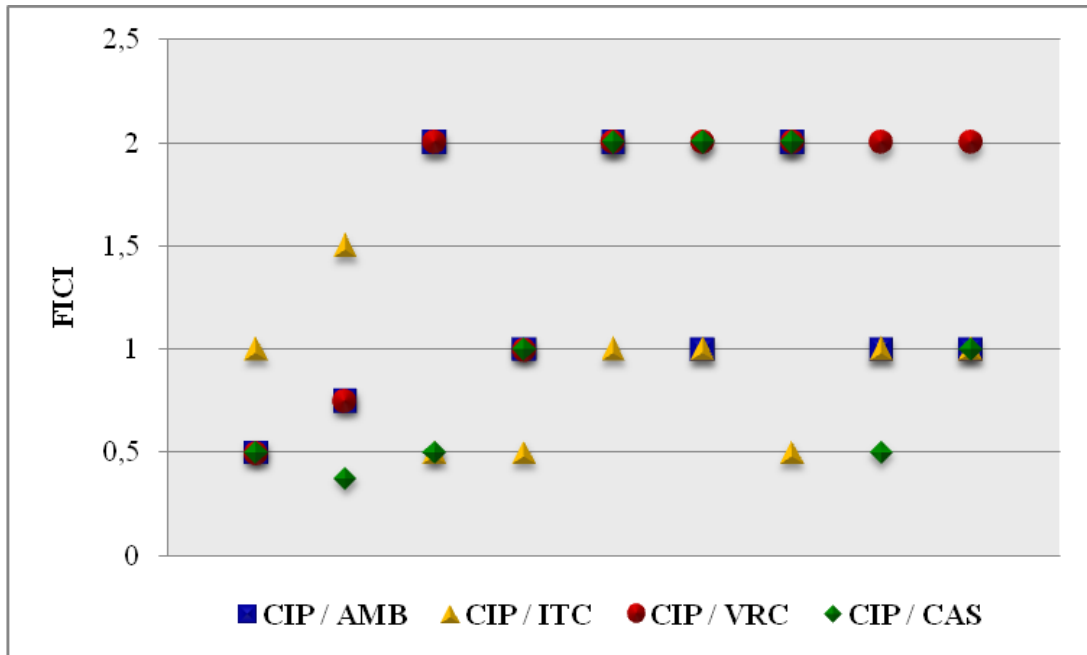


Figura 25. Índice da concentração inibitória fracionária (FICI) da droga ciprofloxacina em combinação com os antifúngicos frente às 16 cepas de *H. capsulatum* (fase leveduriforme).

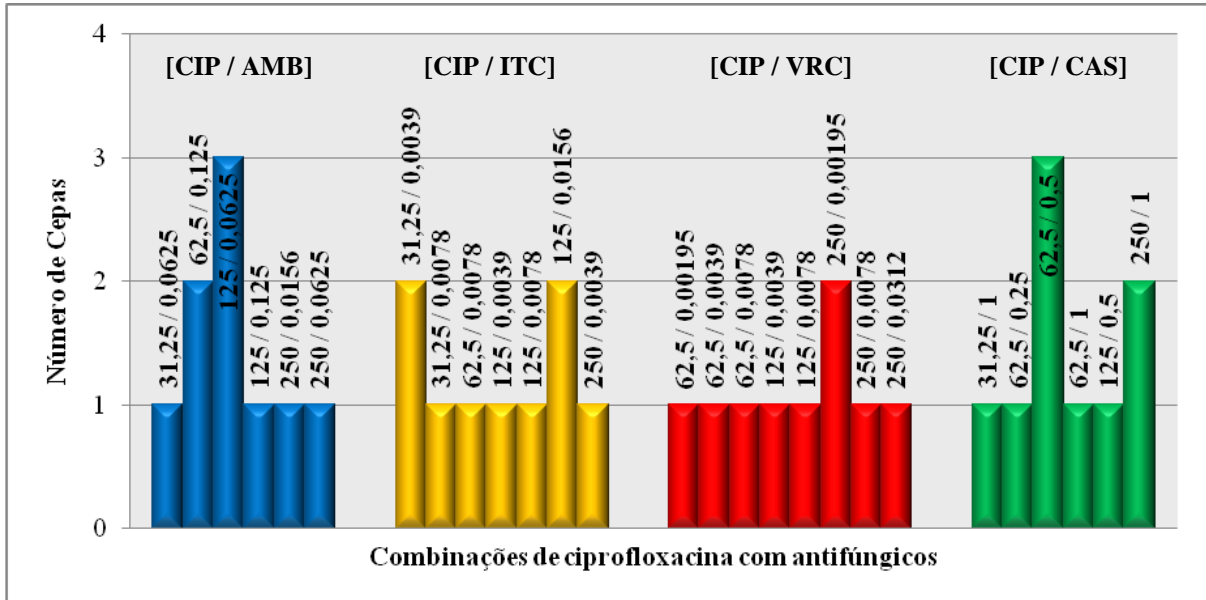


Figura 26. Concentração inibitória mínima (CIM) da droga ciprofloxacina em combinação com os antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e caspofungina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) frente às 16 cepas de *H. capsulatum* (fase leveduriforme).

6.3 Teste de ciprofloxacina em baixa concentração associada à anfotericina B

Na avaliação dos resultados para as cepas de *C. posadasii*, foi possível verificar maior número de interações sinérgicas na combinação de ciprofloxacina em baixa concentração com anfotericina B ($n = 13/16$), apresentando valores de FICI menores ($p = 0,0022$) (FICI: 0,06875 a 0,275) quando comparado ao resultado obtido para a combinação de ciprofloxacina em concentração elevada com anfotericina B ($n = 3/16$). As demais interações mostraram-se indiferentes, com valores de FICI variando de 0,55 a 1,1. Estes dados podem ser observados na Figura 27. As cepas apresentaram os seguintes CIMs e médias geométricas, respectivamente: ciprofloxacina (0,625 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 2,195 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com anfotericina B (0,0078 a 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 2,0241 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 29).

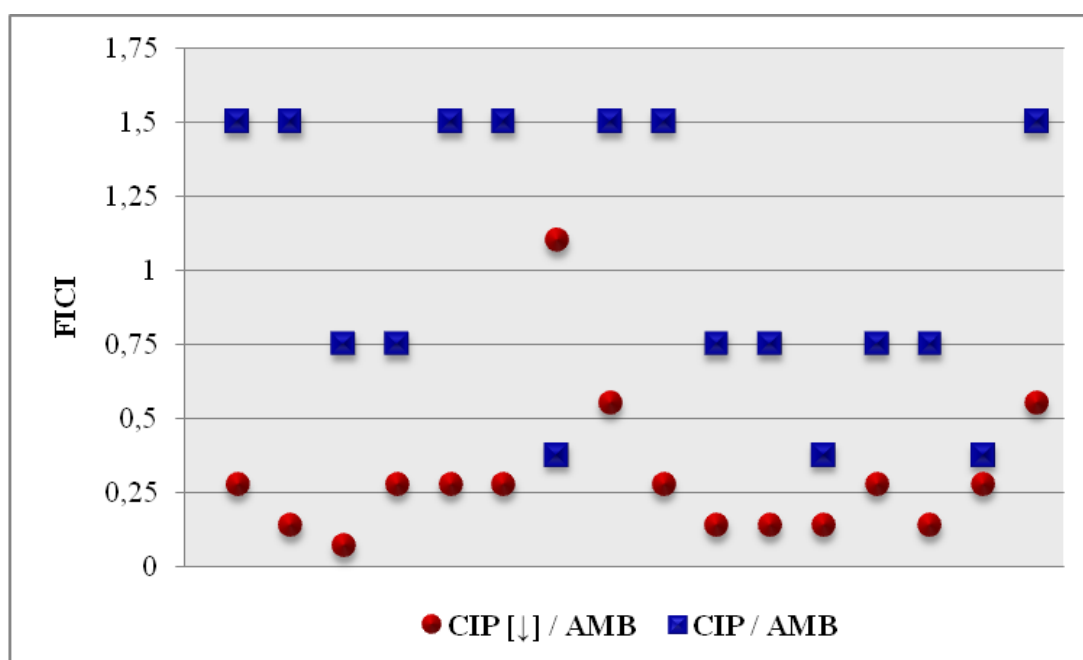


Figura 27. Índice da concentração inibitória fracionária (FICI) da combinação de ciprofloxacina em baixa concentração [↓] com anfotericina B comparada à associação de ciprofloxacina em elevada concentração com anfotericina B frente às 16 cepas de *C. posadasii*.

Para *H. capsulatum* (fase filamentosa), foi verificado um menor número de interações sinérgicas para a combinação de ciprofloxacina em baixa concentração com anfotericina B ($n = 2/16$) (FICI: 0,3), não havendo diferença estatística significativa quando comparado ao resultado alcançado para a combinação de ciprofloxacina em concentração elevada com anfotericina B ($n = 6/16$). As demais interações mostraram-se indiferentes, com valores de FICI variando de 0,6 a 1,2. Estes dados podem ser observados na Figura 28. As

cepas apresentaram os seguintes CIMs e médias geométricas, respectivamente: ciprofloxacina (25 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 62,093 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com anfotericina B (0,0078 a 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,0846 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 29).

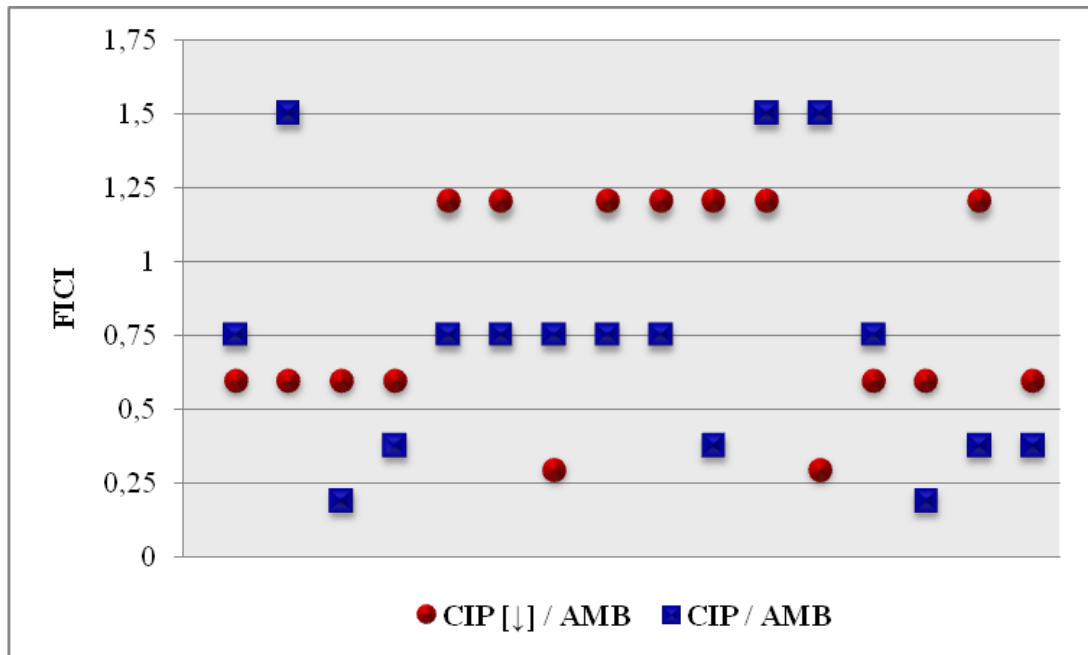


Figura 28. Índice da concentração inibitória fracionária (FICI) da combinação de ciprofloxacina em baixa concentração [↓] com anfotericina B comparada à associação de ciprofloxacina em elevada concentração com anfotericina B frente às 16 cepas de *H. capsulatum* (fase filamentosa).

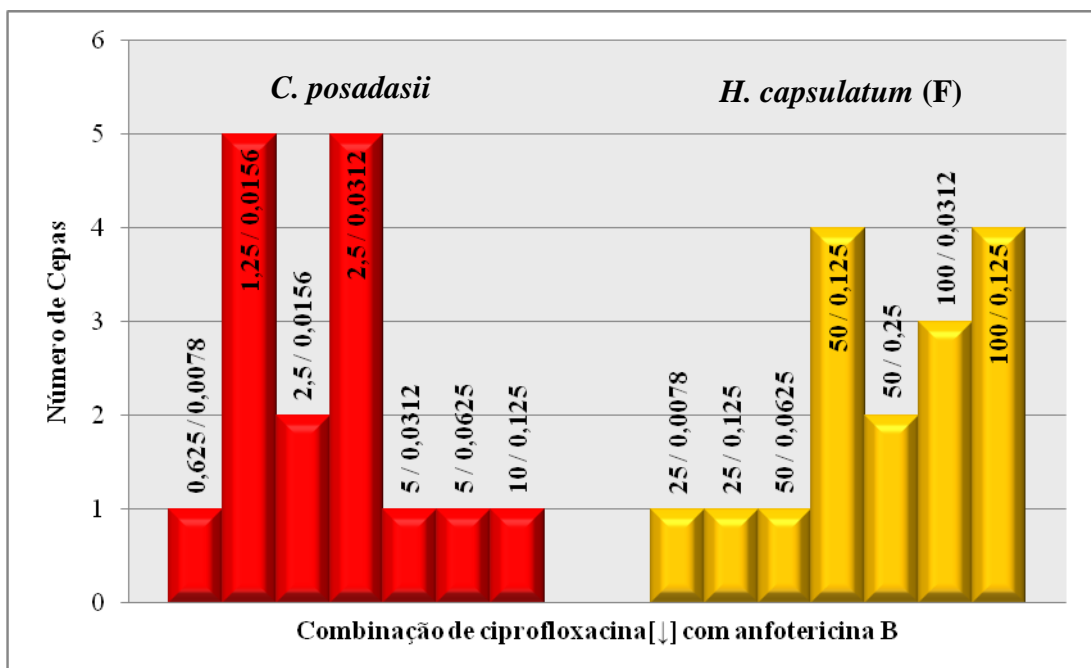


Figura 29. Concentração inibitória mínima (CIM) da combinação de ciprofloxacina em baixa concentração [↓] com anfotericina B ($\mu\text{g mL}^{-1}$) frente às 16 cepas de *C. posadasii* e às 16 cepas de *H. capsulatum* (fase filamentosa).

7 DISCUSSÃO

O aumento do número de casos de micoses profundas e oportunistas, bem como casos de refratariedade ao tratamento e recidivas são fatos preocupantes para a comunidade médica e científica (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A disponibilidade de um pequeno número de drogas antifúngicas como anfoterina B, derivados azólicos e equinocandinas (GONZÁLEZ, 2009), e a verificação de espécies patogênicas resistentes aos fármacos acarretam dificuldades ao tratamento dessas micoses, o que leva a necessidade de uma investigação de novas drogas. Dessa maneira, vários estudos têm contribuído para o desenvolvimento de novos agentes a fim de ampliar o arsenal terapêutico antifúngico, como por exemplo, compostos da classe dos derivados azólicos, como o voriconazol, posaconazol e ravuconazol, e da classe das equinocandinas, como a caspofungina, micafungina e anidulafungina (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008).

Além da descoberta desses novos fármacos, pesquisas têm sido realizadas no sentido de investigar novos compostos que não são utilizados na terapia antifúngica, mas que podem apresentar um amplo espectro de ação frente a espécies fúngicas, caracterizados por substâncias químicas, produtos naturais ou drogas antibacterianas (LACAZ et al., 2002; FONTENELLE et al., 2007; HANAFY et al., 2007).

A atividade *in vitro* dessas “drogas não-antifúngicas” vem sendo testada de maneira isolada ou em combinação com drogas antifúngicas (CORDEIRO et al., 2009a). Dessa forma, a interação entre drogas antifúngicas e não-antifúngicas pode se mostrar como uma alternativa para o tratamento de pacientes com infecções fúngicas graves não responsivos a monoterapia antifúngica habitual (CUENCA-ESTRELLA et al., 2006; O’SHAUGHNESSY et al., 2006), e de pacientes infectados com cepas resistentes (CHOU, 2006).

O uso de drogas múltiplas com diferentes mecanismos de ação deve agir de maneira mais eficaz contra o microrganismo, devido à sua provável ação frente a diversos alvos, o que deverá possibilitar redução na dosagem das drogas, e conseqüentemente minimizar a toxicidade e os efeitos colaterais causados por cada fármaco, bem como minimizar o fenômeno da resistência (CHOU, 2006). No entanto, ainda são necessários estudos adicionais a respeito da importância desses agentes isolados ou em combinação na terapêutica das infecções fúngicas (AFELTRA; VERWEIJ, 2003).

As quinolonas, que são um exemplo de drogas não-antifúngicas destacadas neste trabalho, podem apresentar uma ação antifúngica quando combinadas com outros agentes antifúngicos, cujos resultados são comentados mais adiante.

As técnicas de microdiluição e macrodiluição utilizadas no presente estudo seguiram as normas padronizadas descritas pelos documentos M27-A2 e M38-A do CLSI, respectivamente (CLSI, 2002a; 2002b), apesar destes documentos não contemplarem a análise de sensibilidade *in vitro* de fungos dimórficos, como as espécies de *H. capsulatum* e *C. posadasii* utilizadas neste estudo, sendo necessário, dessa maneira, a inclusão de algumas adaptações nos protocolos utilizados, tais como, tamanho do inóculo, tempo e temperatura de incubação, e critério de leitura, determinadas com base na taxa de crescimento das espécies fúngicas utilizadas, a fim de permitir a obtenção de dados reprodutíveis, a exemplo de outros trabalhos também realizados para fungos dimórficos com base nestes mesmos documentos padronizados pelo CLSI (NAKAI et al., 2003; CORDEIRO et al., 2006c; BRILHANTE et al., 2010).

A técnica de macrodiluição foi direcionada para a espécie *C. posadasii*, de acordo com trabalhos realizados por Nakai et al. (2003) e Cordeiro et al. (2006b; 2006c; 2009a), devido principalmente ao rápido e extenso crescimento deste fungo, não sendo indicado seu uso em uma placa de microdiluição. No tocante a técnica de microdiluição, esta foi utilizada para a espécie de *H. capsulatum* por ter como base os critérios de estudos realizados por Nakai et al. (2003) e Brilhante et al. (2010). Marques (2009) fez uso da técnica de macrodiluição para cepas de *H. capsulatum*, apresentando CIMs similares aos dados obtidos para anfotericina B, itraconazol e voriconazol nesta pesquisa. Alguns trabalhos como Barchiesi et al. (1994), Espinel-Ingroff et al. (1995) e Pujol et al. (1996) compararam as técnicas de micro e macrodiluição para algumas espécies de leveduras e fungos filamentosos frente aos principais agentes antifúngicos empregados na terapia, e verificaram que não existem diferenças marcantes entre os resultados obtidos através das duas técnicas adotadas. Tais fatos sugerem que o uso de diferentes técnicas de diluição no presente estudo não deve influenciar os resultados obtidos.

Os valores de CIM das drogas antifúngicas frente a cepas de *C. posadasii* e *H. capsulatum* demonstrados neste trabalho foram baseados em resultados obtidos em experimentos anteriores do Centro Especializado em Micologia Médica. Todas as cepas de *C. posadasii* e *H. capsulatum* avaliadas mostraram-se sensíveis aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e caspofungina.

A anfotericina B, que continua a ser a droga de escolha para o tratamento da forma disseminada da coccidioidomicose apesar de sua toxicidade (NAKAI et al., 2003), apresentou CIMs frente às cepas de *C. posadasii* que variaram de 0,0625 a 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo semelhantes aos dados relacionados à suscetibilidade de *C. immitis* relatados por Nakai et al. (NAKAI et al., 2003), com CIMs variando de 0,0625 a 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, estes

resultados para *C. posadasii* apresentaram pequenas diferenças quando comparados aos resultados descritos por González et al. (2001), Li et al. (2000) e Lutz et al. (1997), que mostraram CIMs maiores a $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O itraconazol, que é recomendado para o tratamento de casos leves ou moderados de coccidioidomicose (BIALEK, 2004), apresentou CIMs para *C. posadasii* que estavam de acordo com a literatura, quando comparados a resultados obtidos para *C. immitis*, como relatado por vários autores (NAKAI et al., 2003; GONZÁLEZ et al., 2002; LI et al., 2000).

O voriconazol é um antifúngico que possui uma atividade fungistática frente a alguns fungos dimórficos como *B. dermatitidis*, *C. immitis* (LI et al., 2000), apresentando eficácia frente casos refratários de coccidioidomicose, possivelmente causados também por *C. posadasii* (PROIA; TENORIO, 2004). Neste estudo, os CIMs de *C. posadasii* obtidos para esta droga variaram de $0,125$ a $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, dados estes que concordam com os relatos de Li et al. (2000), que encontraram CIMs de $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ para 100 cepas de *C. immitis*.

A caspofungina tem mostrado atividade *in vitro* contra vários fungos patogênicos (VALÉRIE; HERBRECHT, 2003). A droga é um inibidor da síntese de 1,3- β -D-glucano, um componente da parede celular que proporciona a integridade estrutural e estabilidade osmótica na maioria fungos patogênicos (GONZÁLEZ et al., 2001). Neste trabalho, os CIMs de *C. posadasii* obtidos para esta droga variaram de 16 a $32 \mu\text{g mL}^{-1}$. De acordo com González et al. (2001), a caspofungina apresenta baixa atividade *in vitro* contra *C. immitis*, mas é altamente eficaz no tratamento experimental de coccidioidomicose.

As cepas clínicas e ambientais de *C. posadasii* apresentaram valores semelhantes de CIM, o que sugere que isolados de ambas as fontes apresentam o mesmo padrão de susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro*. No entanto, mais investigações são necessárias no sentido de avaliar esta hipótese.

No tocante às cepas de *H. capsulatum* (fase filamentosa), os resultados para anfotericina B, droga de primeira escolha para a terapêutica de casos mais graves da histoplasose (KAUFFMAN, 2009), confirmam sua eficácia, com intervalos de CIM de $0,0078$ a $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, dados também verificados por Espinel-Ingroff et al. (2008). Outros resultados aproximados foram verificados em alguns estudos realizados por Nakai et al. (2003), González (2009) e Marques (2009), que demonstraram um intervalo CIM de $0,06$ a $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Dados apresentados por outros autores demonstraram valores de CIM variando de $0,125$ a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ANDREU et al., 2003) e $0,25$ a $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ESPINEL-INGROFF, 1998). A variação de alguns parâmetros nos métodos adotados entre estas pesquisas e o presente trabalho pode explicar a diferença entre alguns dos resultados alcançados. As cepas de *H. capsulatum* (fase leveduriforme) utilizadas neste estudo apresentaram alguns valores de

CIM para anfotericina B superiores aos encontrados para *H. capsulatum* (fase filamentosa), com um intervalo de 0,0625 a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Este resultado assemelha-se a dados obtidos por Nakai et al. (2003), que apresentaram valores de CIM de 0,125 a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, Kohler et al. (2000) observaram CIMs mais elevados que variaram de 0,5 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os resultados encontrados para itraconazol frente a *H. capsulatum* (fase filamentosa) correspondem aos mesmos valores verificados por Nakai et al. (2003) e Marques (2009), com CIMs variando de 0,0039 a 0,0312 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, estes mesmos valores mostraram-se mais baixos que os descritos por Espinel-Ingroff (1998) (CIM: 0,0625 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Li et al. (2000) (CIM: 0,0312 a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Andreu et al. (2003) (CIM: 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Espinel-Ingroff et al. (2008) (CIM: 0,0078 a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e González (2009) (CIM: 0,25 a 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As cepas de *H. capsulatum* (fase leveduriforme) apresentaram resultado semelhante ao encontrado para *H. capsulatum* (fase filamentosa) frente à itraconazol, corroborando com estudos realizados por Connolly et al., (1999), que mostraram CIMs menores que 0,019 $\mu\text{g mL}^{-1}$; e Nakai et al. (2003), com o intervalo de CIM variando de 0,0039 a 0,0156 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dentre os derivados azólicos, o itraconazol é a droga mais ativa contra *H. capsulatum*, sendo utilizada no tratamento da histoplasmose pulmonar aguda e crônica (WHEAT et al., 2007). A eficácia *in vitro* de itraconazol pode ser explicada pelo fato de que a droga possui dois alvos moleculares na célula fúngica, a enzima 14 α -demetilase e a enzima 3-cetosterol redutase, ambas envolvidas na via biossintética do ergosterol (ANDREU et al., 2003).

Quanto à atividade antifúngica de voriconazol frente a *H. capsulatum* (fase filamentosa), foram observados CIMs variando de 0,0625 a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Alguns estudos mostraram valores aproximados ou inferiores, como Wheat et al. (2006) e Marques (2009), que demonstraram CIMs entre 0,0156 e 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e Espinel-Ingroff et al. (2008), com valores de CIM entre 0,0078 a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; enquanto que outros estudos apresentaram valores aproximados ou superiores, como Espinel-Ingroff (1998), Li et al. (2000) e González (2009), os quais demonstraram valores de CIM que abrangeram o intervalo de 0,0625 a 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, foram verificados valores muito baixos de CIM para as cepas testadas de *H. capsulatum* (fase leveduriforme) frente à voriconazol, compreendendo um intervalo de 0,00195 a 0,0312 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estudos mais aprofundados são necessários a fim de justificar a diferença marcante entre os valores de CIM encontrados nas duas fases de *H. capsulatum*. Os dados obtidos também revelaram que os valores de CIM expressos pelo voriconazol para *H. capsulatum* (fase filamentosa) mostraram-se mais altos que os de itraconazol, enquanto que para *H. capsulatum* (fase leveduriforme), foi observada uma situação contrária.

A caspofungina possui atividade *in vitro* frente a *H. capsulatum*, no entanto, os valores de CIM apresentam-se elevados (ESPINEL-INGROFF, 1998; DERESINSKI;

STEVENS, 2003), revelando uma eficácia limitada *in vitro* e *in vivo* (KOHLENER et al., 2000). Para as cepas de *H. capsulatum* (fase filamentosa), os valores de CIM variaram bastante, abrangendo um intervalo entre 0,25 e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que para as cepas de *H. capsulatum* (fase leveduriforme), foram verificados valores inferiores que abrangeram um intervalo entre 0,5 e 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo necessária uma maior investigação que possa esclarecer o real motivo da diferença entre esses dados. Kohler et al. (2000) revelaram resultados para *H. capsulatum* (fase leveduriforme) com valores de CIM elevados, variando de 8 a 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dessa maneira, existe uma dificuldade em observar um perfil de sensibilidade para *H. capsulatum* frente à caspofungina, sendo necessários mais estudos que possam elucidar esta questão.

Os valores de CIM para as drogas antifúngicas podem variar frente às fases filamentosa e leveduriforme de *H. capsulatum*, como demonstrado por Kohler et al. (2000), Andreu et al. (2003), Nakai et al. (2003), dentre outros trabalhos. Vale salientar que poucos estudos têm comparado os dados dos testes de sensibilidade *in vitro* entre as duas formas de *H. capsulatum* (ANDREU et al., 2003; NAKAI et al., 2003). Apesar da maioria dos autores darem preferência à fase leveduriforme, provavelmente por ser a forma infectante do microrganismo (CONNOLLY et al., 1999; WHEAT et al., 2006), ainda não existem estudos que determinem qual a fase do fungo, usada em experimentos *in vitro*, que pode manter uma melhor correlação com a resposta terapêutica.

DNA topoisomerases são enzimas essenciais para o processo de replicação, recombinação e reparo do DNA, onde atuam na estabilização da molécula recém-construída de DNA (SHEN et al., 1992). Estas enzimas são reconhecidas como alvos de agentes terapêuticos, que atuam através da capacidade de estabilizar o complexo de clivagem da DNA topoisomerase, desencadeando a morte celular (FOSTEL; MONTGOMERY; SHEN, 1992).

As quinolonas são drogas antibacterianas capazes de inibir a atividade da DNA topoisomerase II (DNA girase) e DNA topoisomerase IV de bactérias (SUGAR; LIU; CHEN, 1997). Considerando o fato de que DNA topoisomerases estarem presentes em ambas as células procarióticas e eucarióticas, e que altos níveis de topoisomerase I e II têm sido relatados em fungos patogênicos (FOSTEL; MONTGOMERY; SHEN, 1992; SHEN et al., 1992; SHEN; FOSTEL, 1994), surgiu um interesse em avaliar a atividade antifúngica das quinolonas.

As quinolonas atualmente usadas mostram uma boa seletividade para a enzima alvo das bactérias, sem causar efeitos colaterais graves para o hospedeiro (SHEN et al., 1992; NAKAJIMA et al., 1995). Fostel; Montgomery; Shen (1992) relataram a existência de diferenças bioquímicas entre a DNA topoisomerase fúngica e do hospedeiro. Outros estudos

relataram que quinolonas podem apresentar uma resposta maior frente à enzima alvo de fungos em comparação à enzima de mamíferos (SHEN et al., 1992; SHEN; FOSTEL, 1994). Tais fatos sugerem que a DNA topoisomerase fúngica pode servir como um alvo para a ação de agentes antifúngicos, como as quinolonas.

A investigação sobre o potencial antifúngico das quinolonas não é recente, sendo relatados a mais de 10 anos. Polak (1990) demonstrou em seus estudos efeito sinérgico entre a combinação de fleroxacina e cetoconazol, frente à *C. albicans*. Nakajima et al. (1995) verificaram que a fluoroquinolona DU-6859a, que possui estrutura similar à ciprofloxacina, quando combinada com os agentes antifúngicos anfotericina B e fluconazol revelaram excelentes resultados frente a espécies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* em experimentos *in vitro*, bem como *in vivo*.

Estudos realizados por Sugar; Liu; Chen, (1997) mostraram que as quinolonas trovafloxacina e ciprofloxacina em combinação com anfotericina B e fluconazol foram eficazes no tratamento de candidíase invasiva em modelo murino, resultado este não evidenciado quando as drogas foram utilizadas isoladamente. Posteriormente, Sugar; Liu (2000) observaram excelente resultado para as associações de trovafloxacina e ciprofloxacina com fluconazol no tratamento de mucormicose pulmonar em modelo murino.

Sasaki et al. (2000) verificaram resultados promissores para o tratamento de candidíase em modelo murino através da utilização de ofloxacina associada ao fluconazol. Turner; Samuel (2004) relataram um caso de paciente com zigomicose cerebral que atingiu a cura através do tratamento com a associação entre ciprofloxacina, anfotericina B lipossomal e caspofungina.

A ciprofloxacina, droga que leva destaque no presente trabalho, é uma fluoroquinolona que possui a capacidade de se ligar a topoisomerase II dos fungos, inibindo a replicação do DNA desses microrganismos (SHEN; FOSTEL, 1994). Interações farmacodinâmicas *in vitro* foram encontradas entre ciprofloxacina associada aos agentes antifúngicos anfotericina B, fluconazol, voriconazol e caspofungina frente à *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* (STERGIOPOULOU et al., 2008), onde a ciprofloxacina contribuiu para o aumento da atividade dos antifúngicos, mostrando-se muito mais eficiente do que outras quinolonas, como moxifloxacina e levofloxacina, as quais foram testadas posteriormente da mesma maneira (STERGIOPOULOU et al., 2009).

Considerando-se que o potencial antifúngico de ciprofloxacina só é observado quando esta se encontra associada a antifúngicos, sucinta-se a hipótese que determinados antimicóticos alteram a permeabilidade da membrana celular do fungo e, assim, aumentam os níveis intracelulares desta quinolona, favorecendo sua ação inibitória frente à topoisomerase

II do fungo (STERGIOPOULOU et al., 2009). Os dados encontrados com a associação de ciprofloxacina e os derivados azólicos, no presente trabalho, corroboram esta informação. Entretanto, a anfotericina B, que sabidamente forma poros na membrana fúngica, alterando a permeabilidade celular, não apresentou resultados semelhantes quando associada à ciprofloxacina. Tal evidência nos leva a criar a hipótese, que, provavelmente, este efeito sinérgico, particularmente com derivados azólicos, ocorra por inibição da síntese de ergosterol.

Ratificando esta hipótese, foi observado maior número de interações sinérgicas entre ciprofloxacina com itraconazol e voriconazol frente a *C. posadasii* e *H. capsulatum* (fase filamentosa). Ademais, tem sido demonstrado que a ciprofloxacina pode aumentar a ação de antifúngicos azólicos pela sobreposição da especificidade do substrato de transportadores ATP-binding cassette (bombas de efluxo de drogas), resultando em maiores concentrações intracelulares de agentes antifúngicos em cepas de *C. albicans* e *A. fumigatus* (STERGIOPOULOU et al., 2008). Este fato poderia também explicar, pelo menos em parte, o sinergismo observado entre ciprofloxacina e os derivados azólicos para os fungos dimórficos.

A caspofungina obteve efeito sinérgico em 87,5% das cepas de *C. posadasii*. Este achado corrobora, em parte, com o estudo realizado por González et al. (2007), que demonstraram, *in vivo*, a eficácia desta equinocandina sozinha ou em combinação em modelo de coccidioidomicose experimental (GONZÁLEZ et al., 2007). Uma hipótese citada por Stergiopoulou et al. (2009), que poderia justificar tal resultado, seria a capacidade de ciprofloxacina influenciar no aumento da sensibilidade de (1,3)- β -D-glucano sintase para equinocandinas. Entretanto, a farmacodinâmica da associação de ciprofloxacina e caspofungina em fungos dimórficos precisa ainda ser elucidada.

As moléculas de ciprofloxacina apresentam-se como monômeros em baixas concentrações, enquanto que em maiores concentrações se auto-associam formando um arranjo. Dessa forma, ciprofloxacina em baixas concentrações, pode participar da formação de poros induzidos por anfotericina B, na membrana celular de fungos e, assim, produzir um efeito sinérgico, reforçando a ação antifúngica desta droga. No entanto, a auto-associação de moléculas de ciprofloxacina em concentrações elevadas poderia interferir na formação de poros pela anfotericina B, diminuindo a atividade antifúngica da mesma e, assim, acabar produzindo um efeito antagônico (STERGIOPOULOU et al., 2008). Neste sentido, Stergiopoulou et al. (2008) demonstraram a interação dose-dependente que anfotericina B possui com ciprofloxacina frente a *C. albicans* e *A. fumigatus*.

No presente estudo, o teste de avaliação do efeito de ciprofloxacina (CIP) em baixa concentração associada à anfotericina B frente a cepas de *C. posadasii* (CIP: 0,625 a 10

$\mu\text{g mL}^{-1}$) e *H. capsulatum* (fase filamentosa) (CIP: 0,195 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) confirmou a interação dose-dependente de anfotericina B com ciprofloxacina, sendo verificado maior número de cepas de *C. posadasii* ($n = 13/16$) apresentando efeito sinérgico, quando comparado ao resultado utilizando concentração mais elevada (CIP: 6,25 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) ($n = 3/16$). No entanto, não foi observada diferença significativa nos resultados para as cepas de *H. capsulatum* (fase filamentosa) ($n = 2/16$ para ciprofloxacina em baixa concentração; $n = 6/16$ para ciprofloxacina em concentração mais elevada – CIP: 0,975 a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Baseado no trabalho de Van Duin; Casadevall; Nosanchuk (2002), uma provável causa para a ausência de sinergismo das combinações de ciprofloxacina com os antifúngicos anfotericina B e caspofungina frente a *H. capsulatum* (fase filamentosa) seria a capacidade de melanização do microrganismo, a qual reduz sua susceptibilidade à anfotericina B e caspofungina (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002). Ademais, o fato das equinocandinas não serem eficazes no tratamento da histoplasmose (KAUFFMAN, 2009), corroboram nossos resultados obtidos *in vitro*, onde foram observados CIMs elevados para caspofungina e interações indiferentes para a associação de ciprofloxacina com caspofungina frente a *H. capsulatum* (fase filamentosa).

A droga ciprofloxacina utilizada isoladamente não foi capaz de inibir o crescimento de *C. posadasii* e *H. capsulatum* (fase filamentosa). No entanto, foi possível determinar valores de CIM de ciprofloxacina para quase todas as cepas de *H. capsulatum* (fase leveduriforme) testadas neste trabalho ($n = 8/9$), abrangendo um intervalo de 62,5 a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. A obtenção de CIMs reduzidos para ciprofloxacina isolada frente à *H. capsulatum* (fase leveduriforme) quando comparado aos resultados obtidos para *H. capsulatum* (fase filamentosa) neste trabalho, corroboram com estudos que têm demonstrado cepas de *H. capsulatum* na fase leveduriforme apresentando CIMs com valores bem menores frente a antimicrobianos quando comparados a cepas na fase filamentosa (NAKAI et al., 2003; BRILHANTE et al., 2010). O presente estudo não verificou resultados significativos no que diz respeito ao sinergismo observado nas combinações de ciprofloxacina com os antifúngicos frente às cepas de *H. capsulatum* (fase leveduriforme). Entretanto, mais estudos devem ser realizados a fim de melhor esclarecer estes achados, considerando os eventos que ocorrem durante o dimorfismo fúngico.

Por fim, a presente pesquisa forneceu dados relevantes sobre o potencial antifúngico de ciprofloxacina associada a drogas antifúngicas frente a fungos dimórficos, que apontam novas alternativas para a terapia de coccidioomicose e histoplasmose, abrindo

perspectivas para o delineamento de estudos *in vivo*, bem como estudos mais aprofundados da farmacodinâmica da interação destes compostos frente às espécies fúngicas testadas.

8 CONCLUSÕES

1. A droga ciprofloxacina isolada não exibiu atividade antifúngica, *in vitro*, frente às cepas testadas, com exceção apenas para 8 cepas de *H. capsulatum* (fase leveduriforme).

2. O efeito inibitório *in vitro* de ciprofloxacina foi potencializado pela combinação com as drogas antifúngicas frente a *C. posadasii* e *H. capsulatum*. Todas as associações apresentaram atividade antifúngica.

3. As combinações de ciprofloxacina com os derivados azólicos, com destaque para o voriconazol, demonstraram sinergismo para um maior número de cepas.

4. A interação de ciprofloxacina em baixa concentração com anfotericina B apresentou maior sinergismo frente às cepas de *C. posadasii*.

BIBLIOGRAFIA

AFELTRA, J.; VERWEIJ, P. E. Antifungal activity of nonantifungal drugs. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 397-407, 2003.

AGUILAR, J. A.; SUMMERSON, C.; GRANDA, M.C.; JIMÉNEZ, C.; DE LA TORRE S. Pericarditis caused by coccidioidomycosis. Report of a case. **Archivos de Cardiología de México**, v. 71, n. 4, p. 313-318, 2001.

AMPEL, N. M. Coccidioidomycosis in persons infected with HIV type 1. **Clinical Infections Diseases**, v. 42, n. 7, p. 1174-1178, 2005.

AMPEL, N. M.; GIBLIN, A.; MOURANI, J.P.; GALGIANI, J. N. Factors and outcomes associated with the decision to treat primary pulmonary coccidioidomycosis. **Clinical Infections Diseases**, v. 48, n. 2, p. 172-178, 2009.

ANDREU, C. M. F.; LEÓN, A. M.; MEDINA, Y. E.; MACHÍN, G. M.; LANCHA, M. R. P.; ZARAGOZÍ, M. T. I. Sensibilidad *in vitro* de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* frente a anfotericina B, ketoconazol, itraconazol y fluconazol. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 55, n. 2, p. 76-82, 2003.

ANTONY, S. Use of the echinocandins (caspofungin) in the treatment of disseminated coccidioidomycosis in a renal transplant recipient. **Clinical Infections Diseases**, v. 39, n. 6, p. 879-880, 2004.

ARSURA, E. L.; BOBBA, R. K.; REDDY, C. M. Coccidioidal pericarditis: a case presentation and review of the literature. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 104-109, 2005.

AZANZA, J. R.; MONTEJO, M. Farmacocinética y farmacodinamia. Interacciones y efectos secundarios. Comparación con otras equinocandinas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 26, n. 14, p. 14-20, 2008.

BAPTISTA-ROSAS, R. C.; HINOJOSA, A.; RIQUELME, M. Ecological niche modeling of *Coccidioides* spp. in western North american deserts. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1111, n. 1, p. 35-46, 2007.

BARCHIESI, F.; COLOMBO, A. L.; MCGOUGH, D. A.; RINALDI, M.G. Comparative study of broth macrodilution and microdilution techniques for *in vitro* antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards' proposed standard. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2494-2500, 1994.

BARKER, B. M.; STATT, S. N.; GALGIANI, J. N.; ORBACH, M. J. Abstract Some Like it Hot: differences in Thermotolerance of *Coccidioides* species. **Sixth International Symposium on Coccidioidomycosis**, abstr. 9, 2006.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 159-172, 2004.

BEZERRA, F. S. **Histoplasmose Infecção em pacientes HIV/AIDS residentes na cidade de Fortaleza, Ceará.** 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

BIALEK R. Amplification of Coccidioidal DNA in clinical specimens by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1982-1985, 2004.

BINNICKER, M. J.; BUCKWALTER, S. P.; EISBERNER, J. J.; STEWART, R. A.; MCCULLOUGH, A. E.; WOHLFIEL, S. L.; WENGENACK, N. L. Detection of *Coccidioides* Species in Clinical Specimens by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 173-178, 2007.

BLAIR, J. E.; COAKLEY, B.; SANTELLI, A. C.; HENTZ, J. G.; WENGENACK, N. L. Serologic testing for symptomatic coccidioidomycosis in immunocompetent and immunosuppressed hosts. **Mycopathologia**, v. 162, n. 5, p. 317-324, 2006.

BLAIR, J. E.; MAYER, A. P.; CURRIER, J.; FILES, J. A.; WU, Q. Coccidioidomycosis in elderly persons. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 12, p. 1513-1518, 2008.

BOHSE, M. L.; WOODS, J. P. Expression and interstrain variability of the YPS3 gene of *Histoplasma capsulatum*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 4, p. 609-615, 2007.

BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; FECHINE, M. A. B.; FURTADO, F. M.; NAGAO, M. A. T. D.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. Coccidioidal pericarditis: a rapid presumptive diagnosis by an in-house antigen confirmed by mycological and molecular methods. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 1288-1292, 2008.

BRILHANTE, R. S. N.; FECHINE, M. A. B.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; RIBEIRO, J. F.; MONTEIRO, A. J.; LIMA, R. A. C.; MESQUITA, J. R. L.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. *In vitro* effect of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3978-3979, 2010.

CAMPOS, H. S. Tratamento da tuberculose. **Pulmão**, v. 16, n. 1, p. 21-31, 2007.

CAPONE, D.; WANKE, B.; MONTEIRO, P. C. F.; LAZÉRA, M. S.; ANDRADE, G. N.; VALLE, A. C. F.; MORENO, A. M. H.; LONDERO, A. T. Chronic pulmonary histoplasmosis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mycopathologia**, v. 145, p. 75-79, 1999.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 19, n. 2, p. 130-139, 2006.

CASTAÑEDA-GODOY, R.; LANIADO-LABORIN, R. Coexistência de tuberculosis y coccidioidomicosis. Presentación dos casos clínicos. **Revista Del Instituto Nacional e Enfermedades Respiratorias do México**, v. 15, n. 2, p. 98-101, 2002.

CASTAÑÓN-OLIVARES, L. R.; 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**, v. 47, n. 4, p. 145-148, 2004.

CASTAÑÓN-OLIVARES, L. R.; GÜEREÑA-ELIZALDE, D.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M. R.; LICEA-NAVARRO, A. F.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, G. M.; AROCH-CALDERÓN, A. Molecular identification of *Coccidioides* isolates from Mexican patients. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1111, p. 326-335, 2007.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, p. 39-49, 2006.

CATANZARO, A. Coccidioidomycosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 25, n. 2, p. 123-128, 2004.

CAZEDEY, E. C. L.; AZEVEDO, R. C. P.; SILVA, E. F.; ARAÚJO, M. B. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de itraconazol em produtos farmacêuticos por CLAE. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 774-776, 2007.

CHANDRASEKAR, P. H.; SOBEL, J. D. Micafungin: A new echinocandin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 1171-1178, 2006.

CHANG, M. R.; TAIRA, C. L.; PANIAGO, A. M. M.; TAIRA, D. L.; CUNHA, R. V.; WANKE, B. Study of 30 cases of Histoplasmosis observed in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 1, p. 37-39, 2007.

CHAPMAN, S. W.; SULLIVAN, D. C.; CLEARY, J. D. In search of the holy grail of antifungal therapy. **Transactions of The American Clinical and Climatological Association**, v. 119, p. 197-216, 2008.

CHILLER, T. M.; GALGIANI, J. N.; STEVENS, D. A. Coccidioidomycosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 17, n. 1, p. 41-57, 2003.

CHOU, T. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, p. 621-681, 2006.

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 – M27-A2**, v. 22, n. 15, 2. ed. Pennsylvania, Estados Unidos, 2002a.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos: Norma aprovada – M38-A**, v. 22, n. 16, Pennsylvania, Estados Unidos, 2002b.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement – M100-S20**, v. 30, n. 1, Pennsylvania, Estados Unidos, 2010.

COLE, G. T. Fungal pathogenesis. In: ANAISSIE, E. J.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. **Clinical Mycology**. New York: Churchill Livingstone, p. 20-45, 2003.

CONNOLLY, P.; WHEAT, J.; SCHNIZLEIN-BICK, C.; DURKIN, M.; KOHLER, S.; SMEDEMA, M.; GOLDBERG, J.; BRIZENDINE, E.; LOEBENBERG, D. Comparison of a

new triazole antifungal agent, Schering 56592, with itraconazole and amphotericin B for treatment of histoplasmosis in immunocompetent mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 322-328, 1999.

CORDEIRO, R. A. **Estratégias para o conhecimento da coccidioidomicose – doença emergente no Nordeste brasileiro**. 2006. 125f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas), Universidade Federal do Ceará. 2006.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; BANDEIRA, S. P.; FECHINE, M. A. B.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. Twelve years of coccidioidomycosis in Ceará State, Northeast Brazil: epidemiologic and diagnostic aspects. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, n. 1, p. 65-72, 2010.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; FECHINE, M. A. B.; CAMARA, L. M. C.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. Phenotypic characterization and ecological features of *Coccidioides* spp. from Northeast Brazil. **Medical Mycology**, v. 44, n. 7, p. 631-639, 2006a.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; FECHINE, M. A. B.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. *In vitro* inhibitory effect of antituberculosis drugs on clinical and environmental strains of *Coccidioides posadasii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 575-579, 2006b.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; FECHINE, M. A. B.; COSTA, A. K. F.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. *In vitro* activities of caspofungin, amphotericin B and azoles against *Coccidioides posadasii* strains from Northeast, Brazil. **Mycopathologia**, v. 161, n. 1, p. 21-26, 2006c.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; MEDRANO, D. J. A.; MONTEIRO, A. J.; TAVARES, J. L.; LIMA, R. A. C.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. *In vitro* synergistic effects of antituberculous drugs plus antifungals against *Coccidioides posadasii*. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 3, p. 278-280, 2009a.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; MOURA, F. E. A.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. Rapid diagnosis of coccidioidomycosis by nested PCR assay of sputum. **Clinical Microbiology Infection**, v. 13, n. 4, p. 449-451, 2007.

CORDEIRO, R. A.; FECHINE, M. A. B.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; COSTA, A. K. F.; NAGAO, M. A. T. D.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. Serologic Detection of Coccidioidomycosis Antibodies in Northeast Brazil. **Mycopathologia**, v. 167, p. 187-190, 2009b.

COSTA, F. A. M.; REIS, R. C.; BENEVIDES, F.; TOMÉ, G. S.; HOLANDA, M. A. Coccidioidomicose pulmonar em caçador de tatus. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 27, n. 5, p. 275-278, 2001.

COUPPIÉ, P.; AZNAR, C.; CARME, B.; NACHER, M. American histoplasmosis in developing countries with a special focus on patients with HIV: diagnosis, treatment, and prognosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 19, p. 443-449, 2006.

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

COX, R. A.; MAGEE, D. M. Coccidioidomycosis: Host response and vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 804-839, 2004.

CRUM-CIANFLONE, N. F.; TRUETT, A. A.; TENEZA-MORA, N.; MAVES, R. C.; CHUN, H. M.; BAVARO, M. F.; HALE, B. R. Unusual presentations of coccidioidomycosis: a case series and review of the literature. **Medicine**, v. 85, n. 5, p. 263-277, 2006.

CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; BUITRAGO, M. J.; MONZON, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 917-921, 2006.

CURY, G. C.; FILHO, A. D.; CRUZ, A. G. C.; HOBAIKA, A. B. S. Surto de histoplasmose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 5, p. 483-486, 2001.

DAHER, E. F.; BARROS, F. A. S.; JÚNIOR, G. B. S.; TAKEDA, C. F. V.; MOTA, R. M. S.; FERREIRA, M. T.; MARTINS, J. C.; OLIVEIRA, S. A. J.; GUTIÉRREZ-ADRIANZÉN, O. A. Risk factors for death in Acquired Immunodeficiency Syndrome-associated disseminated histoplasmosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 4, p. 600-603, 2006.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**. 2. ed. Spain: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht/Universitat Rovira i Virgili, 2000, 1126p.

DERESINSKI, S. *Coccidioides immitis* as a potential bioweapon. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 18, n. 3, p. 216-219, 2003.

DERESINSKI, S. C.; STEVENS D. A. Caspofungin. **Clinical infectious diseases**, v. 36, n. 11, p. 1445-57, 2003.

DEUS FILHO, A. Coccidioidomycosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 9, p. 920-930, 2009.

DEUS FILHO, A.; WANKE, B.; CAVALCANTI, M. A. S.; MARTINS, L. M. S.; DEUS, A. C. B. Histoplasmose no Nordeste do Brasil. Relato de três casos. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 15, n. 1, p. 109-114, 2009.

DICAUDO, D. J. Coccidioidomycosis: a review and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 55, n. 6, p. 929-942, 2006.

DIXON, D. M. *Coccidioides immitis* as a select agent of bioterrorism. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 4, p. 602-605, 2001.

DRUTZ, D. J.; CATANZARO, A. Coccidioidomycosis: state of the art. Part II. **American Review of Respiratory Disease**, v. 177, n. 3, p. 727-771, 1978.

DURKIN, M.; CONNOLLY, P.; KUBERSKI, T.; MYERS, R.; KUBAK, B. M.; BRUCKNER, D.; PEGUES, D.; WHEAT, L. J. Diagnosis of coccidioidomycosis with use of the *Coccidioides* antigen enzyme immunoassay. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 8, p. 69-73, 2008.

EL-AZIZI, M. Enhancement of the *in vitro* activity of amphotericin B against the biofilms of non-albicans *Candida* spp. by rifampicin and doxycycline. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 645-649, 2007.

ELIAS-COSTA, M. R. I.; NEGRONI, R.; GIMENO, S. R. Estudo biológico de un exoantígeno del *Coccidioides immitis*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 9, p. 9-11, 1985.

EMMONS, C. W. Histoplasmosis in animals. **Public Health Monograph**, v. 39, p. 272-273, 1956.

ESPINEL-INGROFF, A. *In vitro* activity of the new triazole voriconazole (uk-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 198-202, 1998.

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. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 20, p. 121-136, 2003.

ESPINEL-INGROFF, A.; BOYLE, K.; SHEEHAN, D. J. *In vitro* antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: Review of the literature. **Mycopathologia**, v. 150, p. 101-115, 2001.

ESPINEL-INGROFF, A.; DAWSON, K.; PFALLER, M.; ANAÏSSIE, E.; BRESLIN, B.; DIXON, D.; FOTHERGILL, A.; PAETZNICK, V.; PETER, J.; RINALDI, M.; WALSH, T. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 2, p. 314-319, 1995.

ESPINEL-INGROFF, A.; JOHNSON, E.; HOCKEY, H.; TROKE, P. Activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B *in vitro* against 590 moulds from 323 patients in the voriconazole Phase III clinical studies. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. 616-620, 2008.

EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2010. Disponível em <<http://eucast.www137.server1.mensemedia.net>>. Acesso em 06 ago. 2010.

EULALIO, K. D.; MACEDO, R. L.; CAVALCANTI, M. A. S.; MARTINS, L. M. S.; LAZERA, M. S.; WANKE, B. *Coccidioides immitis* isolated from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Piauí, northeast Brazil. **Mycopathologia**, v. 149, n. 2, p. 57-61, 2001.

FAVA NETTO, C.; SILVA, U. A.; CHAMMAS, F.; LACAZ, C. S. Histoplasmosse epidêmica: estudo clínico, radiológico, micológico e imunológico de surto ocorrido no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 9, p. 222-232, 1967.

FECHINE, M. A. B. **Inquérito sorológico em regiões com condições geoclimáticas favoráveis e casos índices de coccidioidomicose no sertão do Ceará**. 2005. 110f. Dissertação (Mestrado em Medicina - Clínica Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. 2005.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Histoplasmose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n.2, p. 192-198, 2009.

FIANCHI, L.; PAGANO, L.; CAIRA, M.; NOSARI, A.; VAN LINT, M. T.; CANDONI, A.; OFFIDANI, M.; ALOISI, T.; IRRERA, G.; BONINI, A.; PICARDI, M.; CARAMATTI, C.; INVERNIZZI, R.; MATTEI, D.; MELILLO, L.; WAURE, C.; REDDICONTO, G. Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study - sorveglianza epidemiologica infezioni fungine nelle emopatie maligne. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 9, p. 1161-1170, 2007.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de Anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

FISHER, B. T.; CHILLER, T. M.; PRASAD, P. A.; BEVERIDGE, M.; WALSH T. J.; ZAOUTIS T. E. Hospitalizations for Coccidioidomycosis at Forty-One Children's Hospitals in the United States. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 29, n. 3, p. 243-247, 2010.

FISHER, M. C.; KOENIG, G. L.; WHITE, T. J.; SAN-BLAS, G.; NEGRONI, R.; ALVAREZ, I. G.; WANKE, B.; TAYLOR, J. W. Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World patterns of human migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 98, n. 8, p. 4558-4562, 2001.

FISHER, M. C.; KOENIG, G. L.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Molecular and phenotype description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-Californian population of *Coccidioides immitis*. **Mycologia**, v. 94, n. 1, p. 73-84, 2002.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H.; KERNTOPF, S. M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A. R. M.; QUEIROZ, G. R. N.; NASCIMENTO, R. F.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 934-940, 2007.

FOSTEL, J. M.; MONTGOMERY, D.; LARTEY, P. Comparison of responses of DNA topoisomerase I from *Candida albicans* and human cells to four new agents which stimulate topoisomerase-dependent DNA nicking. **FEMS Microbiology Letters**, v. 138, p. 105-111, 1996.

FOSTEL, J. M.; MONTGOMERY, D. A.; SHEN, L. L. Characterization of DNA topoisomerase I from *Candida albicans* as a target for drug discovery. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 10, p. 2131-2138, 1992.

GALGIANI, J. N.; AMPEL, N. M.; BLAIR, J. E.; CATANZARO, A.; JOHNSON, R. H.; STEVENS, D. A.; WILLIAMS, P. L. Coccidioidomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 9, p. 1217-1223, 2005.

GOBERNADO, M.; CANTÓN, E. Anidulafungina. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 21, n. 2, p. 99-114, 2008.

GOMES, O. M.; SERRANO, R. P.; PRADE, H. O.; BARROS MORAES, N. L.; VARELLA, A. L.; FIORELLI, A. I. Coccidioidomicose pulmonar: primeiro caso nacional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 24, n. 5, p. 167-168, 1978.

- GONZÁLEZ, G. M. *In vitro* activities of isavuconazole against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. **Medical Mycology**, v. 47, p. 71-76, 2009.
- GONZÁLEZ, G. M.; GONZÁLEZ, G.; NAJVAR, L. K.; GRAYBILL, J. R. Therapeutic efficacy of caspofungin alone and in combination with amphotericin B deoxycholate for coccidioidomycosis in a mouse model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 1341-1346, 2007.
- GONZÁLEZ, G. M.; TIJERINA, R.; NAJVAR, L. K.; BOCANEGRA, R.; LUTHER, M.; RINALDI, M. G.; GRAYBILL, J. R. Correlation between antifungal susceptibilities of *Coccidioides immitis* *in vitro* and antifungal treatment with caspofungin in a mouse model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 1854-1859, 2001.
- GONZÁLEZ, G. M.; TIJERINA, R.; NAJVAR, L. K.; BOCANEGRA, R.; RINALDI, M.; LOEBENBERG, D.; GRAYBILL, J. R. *In vitro* and *in vivo* activities of posaconazole against *Coccidioides immitis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1352-1356, 2002.
- GREER, N. D. Posaconazole (Noxafil): a new triazole antifungal agent. **Baylor University Medical Center Proceedings**, v. 20, n. 2, p. 188-196, 2007.
- GUIMARÃES, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Diagnosis of Histoplasmosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 1-13, 2006.
- HAHN, R. C.; MORATO, Y. T.; SANTOS, N. L.; FERREIRA, J. F.; HAMDAN, J. S. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and *in vitro* resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. **Mycoses**, v. 46, p. 324-329, 2003.
- HANAFY, A.; UNO, J.; MITANI, H.; KANG, Y.; MIKAMI, Y. *In vitro* antifungal activities of sulfa drugs against clinical isolates of *Aspergillus* and *Cryptococcus* species. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 38, p. 47-56, 2007.
- HATTON, R. D.; WEAVER, C. T. Immunology. T-bet or not T-bet. **Science**, v. 302, n. 5647, p. 993-994, 2003.
- HECTOR, R. F.; LANIADO-LABORIN, R. Coccidioidomycosis - a fungal disease of the Americas. **Plos Medicine**, v. 2, n. 1, 2005.
- HISTOPLASMOSE, 2010. Disponível em <<http://www.nytimes.com>>. Acesso em 16 set. 2010.
- HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K.; RINALDI, M. G. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 48, p. 153-160, 2004.
- 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. **Biophysical Journal**, v. 83, n. 6, p. 3245-3255, 2002.
- HUNG, C. Y.; SESHAN, K. R.; YU, J. J.; SCHALLER, R.; XUE, J.; BASRUR, V.; GARDNER, M. J.; COLE, G. T. A metalloproteinase of *Coccidioides posadasii* contributes to evasion of host detection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6689-6703, 2005.

HUNG, C. Y.; XUE, J.; COLE, G. T. Virulence mechanisms of *Coccidioides*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1111, p. 225-235, 2007.

JEWELL, K.; CHESHER, R.; CAGE, G. D. Genetic diversity among clinical *Coccidioides* spp. isolates in Arizona. **Medical Mycology**, v. 46, n. 5, p. 449-455, 2008.

JOHNSON, J. E.; EINSTEIN, H. E. Coccidioidal meningitis. **Clinical Infections Diseases**, v. 42, p. 103-107, 2006.

JOHNSON, J. E.; PERRY, J. E.; FEKETY, F. R.; KADULL, P. J.; CLUFF, L. E. Laboratory acquired coccidioidomycosis. **Annals of Internal Medicine**, v. 60, p. 941-956, 2008.

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

JOHNSON, R. H.; EINSTEIN, H. E. Amphotericin B and Coccidioidomycosis. **Annals of the New York Academy Science**, v. 1111, p. 434-441, 2007.

KASUGA, T.; WHITE, T. J.; KOENIG, G.; MCEWEN, J.; RESTREPO, A.; CASTAÑEDA, E.; LACAZ, C. S.; HEINS-VACCARI, E. M.; FREITAS, R. S.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; QIN, Z.; NEGRONI, R.; CARTER, D. A.; MIKAMI, Y.; TAMURA, M.; TAYLOR, M. L.; MILLER, G. F.; POONWAN, N.; TAYLOR, J. W. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 3383-3401, 2003.

KAUFFMAN, C. A. Endemic Mycoses: Blastomycosis, Histoplasmosis, and Sporotrichosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, p. 645-662, 2006.

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, p. 217-225, 2009.

KOBAYASHI, K.; OGASAWARA, M.; KIYAMA, K.; IMAI, K.; HIRANO, T.; KOBAYASHI, N.; TANIMOTO, M.; KASAI, M. Successful voriconazole treatment of invasive pulmonary aspergillosis in a patient with acute biphenotypic leukemia. **Acta Medica Okayama**, v. 63, n. 4, p. 213-216, 2009.

KOHLER, S.; WHEAT, J.; 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1850-1854, 2000.

KUROWSKI, R.; OSTAPCHUK, M. Overview of Histoplasmosis. **American Family Physician**, v. 66, n. 12, p. 2247-2252, 2002.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAN, F.; TONG, Y. Z.; HUANG, H.; XIONG, W. N.; XU, Y. J.; XIONG, S. D. Primary pulmonary coccidioidomycosis in China. **Respirology**, v. 15, n. 4, p. 722-725, 2010.

LANIADO-LABORÍN, R. Coccidioidomicosis. Más que una enfermedad regional. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México**, v. 19, n. 4, p. 301-308, 2006.

LANIADO-LABORÍN, R. Expanding understanding of epidemiology of coccidioidomycosis in the Western hemisphere. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1111, p. 19-34, 2007.

LI, R.; CIBLAK, M. A.; NORDOFF, N.; PASARELL, L.; WARNOCK, D. W.; MCGINNIS, M. R. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1734-1736, 2000.

LÓPEZ, C. E. Dimorfismo y patogenia de *Histoplasma capsulatum*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 38, p. 235-242, 2006.

LUMBRERAS, C.; LIZASOAIN, M.; AGUADO, J. M. Antifúngicos de uso sistémico. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 21, n. 7, p. 366-380, 2003.

LUTZ, J. E.; CLEMONS, K. V.; ARISTIZABAL, B. H.; STEVENS, D. A. Activity of the triazole SCH 56592 against disseminated murine coccidioidomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 1558-1561, 1997.

LYON, G. M.; BRAVO, A. V.; ESPINO, A.; LINDSLEY, M. D.; GUTIERREZ, R. E.; RODRIGUEZ, I.; CORELLA, A.; CARRILLO, F.; MCNEIL, M. M.; WARNOCK, D. W.; HAJJEH, R. A. Histoplasmosis associated with exploring a bat-inhabited cave in Costa Rica, 1998-1999. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 4, p. 438-442, 2004.

MARQUES, F. J. F. Efeito inibitório *in vitro* de Drogas Antituberculose, Antifúngicas e Análogos Químicos da Isoniazida frente a *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. 2009. 129f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica), Universidade Federal do Ceará. 2009.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MEDRANO, D. J. A. Perfil de sensibilidade de cepas de *Coccidioides posadasii* a associação de drogas antimicrobianas. 2010. 166f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas), Universidade Federal do Ceará. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Coccidioidomicose. In: **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**, Ministério da Saúde, Secretaria de vigilância em saúde, Departamento de vigilância epidemiológica. 7. ed. Brasília, Brasil. p. 76-78, 2008.

MIRBOD-DONOVAN, F.; SCHALLER, R.; HUNG, C. Y.; XUE, J.; REICHARD, U.; COLE, G. T. Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 504-515, 2006.

MORAIS, S. S.; MAFRA, M. O.; CANTERLE, E. M.; LIMA, L. L.; RIBEIRO, S. L. E. *Histoplasma capsulatum* simulando espondilodiscite tuberculose em doente com artrite reumatóide. **Acta Reumatológica Portuguesa**, v. 33, p. 360-363, 2008.

MOROYOQUI, N. L. A.; FIGUEROA, S. S. R. Coccidioidomycosis. **Medicina Interna do México**, v. 24, n. 2, p. 125-141, 2008.

MUÑOZ, B.; CASTAÑÓN, L. R.; CALDERÓN, I.; VÁZQUEZ, M. E. ; MANJARREZ, M. E. Parasitic mycelial forms of *Coccidioides* species in Mexican patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1247-1249, 2004.

NAKAI, T.; UNO, J.; IKEDA, F.; TAWARA, S.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. *In vitro* antifungal activity of Miconazole (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1376-1381, 2003.

NAKAJIMA, R.; KITAMURA, A.; SOMEYA, K.; TANAKA, M.; SATO, K. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of DU-6859a, a fluoroquinolone, in combination with amphotericin B and fluconazole against pathogenic fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 1517-1521, 1995.

NOOR, O.; RAO, M.; RAO, B. K. An unusual case of coccidioidomycosis presenting with skin lesions. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 30, n. 5, p. 481-483, 2008.

NOSANCHUK, J. D.; YU, J. J.; HUNG, C. Y.; CASADEVALL, A.; COLE, G. T. *Coccidioides posadasii* produces melanin *in vitro* and during infection. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n. 6, p. 517-520, 2007.

ODDS, F. C. Coccidioidomycosis: flying conidia and severed heads. **Mycologist**, v. 17, p. 37-40, 2003a.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, 2003b.

ODDS, F. G.; GERVEN, F. V.; ESPINEL-INGROFF, A.; BARTLETT, M. S.; GHANNOUM, M. A. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi *in vitro* and antifungal treatment outcomes in animal infection models. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 282-288, 1998.

OLIVEIRA, F. M.; UNIS, G.; SEVERO, L. C. Microepidemia de histoplasmose em Blumenau, Santa Catarina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 4, p. 375-378, 2006.

O'SHAUGHNESSY, E. M.; MELETIADIS, J.; STERGIOPOULOU, T.; DEMCHOK, J. P.; WALSH, T. J. Antifungal interactions within the triple combination of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against *Aspergillus* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 1168-1176, 2006.

PAGE, A. V.; LILES, W. C. Posaconazole: A new agent for the prevention and management of severe, refractory or invasive fungal infections. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 297-305, 2008.

PAIXÃO, G. C.; ROCHA M. F. G.; SIDRIM J. J. C. Coccidioidomycose e blastomicose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 237-251, 2004.

PELLATON, C.; CAVASSINI, M.; JATON-OGAY, K.; CARRON, P. N.; CHRISTEN-ZAECH, S.; CALANDRA, T.; BILLE, J.; HAUSER, P. M. *Histoplasma capsulatum* var.

duboisii infection in a patient with AIDS: rapid diagnosis using polymerase chain reaction-sequencing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, p. 85-89, 2009.

PEREA, S.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; KIRKPATRICK, W. R.; MCATEE, R. K.; SANTILLÁN, R. A.; MARTINEZ, M.; CALABRESE, D.; SANGLARD, D.; PATTERSON, T. F. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance from human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2676-2684, 2001.

PEREIRA JUNIOR, H. R. J.; JORGE, W.; BAGAGLI, E. Por que tatu? **Ciência Hoje**, v. 34, n. 199, p. 70-73, 2003.

PETRIKKOS, G.; SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 108-117, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; MESSER, A. S.; HOLLIS, R. J.; the SENTRY Participants Group. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 to 2000. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 852-856, 2002.

POLAK, A. *In vitro* and *in vivo* activity of antifungal agents in combination with fleroxacin, a new quinolone. **Mycoses**, v. 33, p. 173-178, 1990.

POSADAS, A. Un nuevo caso de micosis fungoidea com psorospermias. **Ann Circulo Medico Argentino**, v. 15, n. 9, p. 585-597, 1892.

PROIA, L. A.; TENORIO, A. R. Successful use of voriconazole for treatment of *Coccidioides* meningitis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2341, 2004.

PUJOL, I.; GUARRO, J.; LLOP, C.; SOLER, L.; J. FERNÁNDEZ-BALLART, J. Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests for the filamentous fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 9, p. 2106-2110, 1996.

RESTREPO, M. A. *Coccidioides immitis* Rixford et Gilchrist 1895, y *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore 1912) Almeida 1930: dos hongos patógenos restringidos al continente americano. **Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 30, n. 116, p. 367-386, 2006.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; WARNOCK, D. W. Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 643-658, 2001.

ROSSINI, T. F.; GOULART, L. S. Histoplasmose clássica: revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 4, p. 275-279, 2006.

SABATELLI, F.; PATEL, R.; MANN, P. A.; MENDRICK, C. A.; NORRIS, C. C.; HARE, R.; LOEBENBERG, D.; BLACK, T. A.; MCNICHOLAS, P. M. *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large

collection of clinically important molds and yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 2009-2015, 2006.

SALLES, J. M. C.; SALLES, M. J. C. **Antimicrobianos (antibacterianos, antifúngicos, antivirais, antiparasitários): quando indicar como usar**. Belém: EDUFPA, p. 381-400, 2000.

SASAKI, E.; MAESAKI, S.; MIYAZAKI, Y.; YANAGIHARA, K.; TOMONO, K.; TASHIRO, T.; KOHNO, S. Synergistic effect of ofloxacin and fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 6, p. 151-154, 2000.

SAUBOLLE, M. A. Laboratory Aspects in the Diagnosis of Coccidioidomycosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1111, p. 301-314, 2007.

SAUBOLLE, M. A.; MCKELLAR, P. P.; SUSSLAND, D. Epidemiologic, clinical, and diagnostic aspects of coccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 26-30, 2007.

SEGURO, F. S.; SILVEIRA, P. A. A. Histoplasmose. **Einstein**, v. 6, n. 3, p. 378-379, 2008.

SHEN, L. L. Quinolone-DNA interaction. In: HOOPER, D. C.; WOLFSON, F. S. **Quinolone antimicrobial agents**. Washington: American Society for Microbiology, p. 77-95, 1993.

SHEN, L. L.; BARANOWSKI, J.; FOSTEL, J. M.; MONTGOMERY, D. A.; LARTEY, P. A. DNA topoisomerases from pathogenic fungi: targets for the discovery of antifungal drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 12, p. 2778-2784, 1992.

SHEN, L. L.; FOSTEL, J. M. DNA topoisomerase inhibitors as antifungal agents. **Advances in Pharmacology**, v. 29, p. 227-244, 1994.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Grupo de consultores de consenso em paracoccidioidomicose. Consenso em paracoccidioidomicose – Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-230, 2006.

SIDRIM J. J. C.; SILVA L. C. L.; NUNES J. M. A.; ROCHA M. F. G.; PAIXAO G. C. L. L'endémie de coccidioidomycose en région nord-est brésilienne, région d'endémie de coccidioidomycose? A propos d'une micro-épidémie. **Journal de mycologie médicale**, v. 7, n. 1, p. 37-39, 1997.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004.

SILVA, L. C. L.; NUNES, L. M. A.; SIDRIM, J. J. C.; GONÇALVES, A. J. R. Coccidioidomicose pulmonar aguda: primeiro surto epidêmico descrito no Ceará – segundo no Brasil. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 72, n. 5, p. 49-66, 1997.

SILVA, T. M. J.; BRITO, M. L.; ALMEIDA, E. R. B.; ADERALDO, L. C.; MESQUITA, J. R. L.; TEIXEIRA, M. J.; POMPEU, M. M. L. Coccidioidomicose pulmonar fatal no semi-árido cearense: relato de um caso e confirmação diagnóstica em animal. In: **XXXV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 32, supl. I, p. 483, 1999.

SMITH, C. E.; WHITING, E. G.; BAKER, E. E.; ROSENBERGER, H. G.; BEARD, R. R.; SAITO, M. T. The use of coccidioidina. **American review of tuberculosis**, v. 57, p. 330-360, 1948.

STANLEY, W.; CHAPMAN, M. D.; SULLIVAN, D. C.; CLEARY, J. D. In search of the Holy Grail of Antifungal Therapy. **Transactions of the American Clinical Climatological Association**, v. 119, p. 197-215, 2008.

STERGIOPOULOU, T.; MELETIADIS, J.; SEIN, T.; PAPAIOANNIDOU, P.; TSIOURIS, I.; ROILIDES, E.; WALSH, T. J. Isobolographic Analysis of Pharmacodynamic Interactions between Antifungal Agents and Ciprofloxacin against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2196-2204, 2008.

STERGIOPOULOU, T.; MELETIADIS, J.; SEIN, T.; PAPAIOANNIDOU, P.; TSIOURIS, I.; ROILIDES, E.; WALSH, T. J. Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 343-348, 2009.

STEVENS, D. A.; RENDON, A.; GAONA-FLORES, V.; CATANZARO, A.; ANSTEAD, G. M.; PEDICONE, L.; GRAYBILL, J. R. Posaconazole therapy for chronic refractory coccidioidomycosis. **CHEST**, v. 132, n. 3, p. 952-958, 2007.

STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.

SUGAR, A. M.; LIU, X. P. Combination Antifungal Therapy in Treatment of Murine Pulmonary Mucormycosis: Roles of Quinolones and Azoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 2004-2006, 2000.

SUGAR, A. M.; LIU, X. P.; CHEN, R. J. Effectiveness of Quinolone Antibiotics in Modulating the Effects of Antifungal Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 2518-2521, 1997.

SUTTON, D. A. Diagnosis of Coccidioidomycosis by Culture - Safety Considerations, Traditional Methods, and Susceptibility Testing. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 1111, p. 315-325, 2007.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

THOMPSON, G. R.; CADENA, J.; PATTERSON, T. F. Overview of Antifungal Agents. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, n. 2, p. 203-215, 2009.

TINTELNOT, K.; DE HOOOG, G. S.; ANTWEILER, E.; LOSERT, H.; SEIBOLD, M.; BRANDT, M. A.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; FISHER, M. C. Taxonomic and diagnostic markers for identification of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. **Medical Mycology**, v. 45, n. 5, p. 385-393, 2007.

TOGASHI, R. H.; AGUIAR, F. M. B.; FERREIRA, D. B.; MOURA, C. M.; SALES, M. T. M.; RIOS, N. X. Pulmonary and extrapulmonary coccidioidomycosis: three cases in an endemic area in the state of Ceará, Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 3, p. 275-279, 2009.

TURNER, E. K.; SAMUEL, R. A patient with cerebral zygomycosis cured with liposomal amphotericin B, caspofungin and ciprofloxacin without intracranial surgery. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 12, n. 1, p. 38-40, 2004.

UMEYAMA, T.; SANO, A.; KAMEI, K.; NIIMI, M.; NISHIMURA, K.; UEHARA, Y. Novel Approach to Designing Primers for Identification and Distinction of the Human Pathogenic Fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR Amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1859-1862, 2006.

UNIS, G.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Histoplasmose disseminada no Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 6, p. 463-468, 2004.

UNIS, G.; SEVERO, L. C. Chronic pulmonary Histoplasmosis mimicking tuberculosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 4, p. 318-324, 2005.

VALÉRIE, L. V.; HERBRECHT, R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 513-521, 2003.

VAN BAMBEKE, F.; MICHOT, J. M.; VAN ELDERE, J.; TULKENS, P. M. Quinolones in 2005: an update. **Clinical Microbiology Infection**, v. 11, p. 256-280, 2005.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394-3400, 2002.

VERAS, K. N.; FIGUEIRÊDO, B. C. S.; MARTINS, L. M. S.; VASCONCELOS, J. T. P.; WANKE, B. Coccidioidomycosis: an unusual cause of acute respiratory distress syndrome. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 29, n. 1, p. 45-48, 2003.

VIANNA, H.; PASSOS, H. V.; SANT'ANA, A. V. Coccidioidomicose: relato do primeiro caso ocorrido em nativo do Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 21, n. 1, p. 51-55, 1979.

VISBAL, G.; SAN-BLAS, G.; MURGICH, J.; FRANCO, H. *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis and antifungal antibiotics. **Current Drug Targets Infectious Disorders**, v. 5, p. 211-226, 2005.

WALSH, T. J.; LARONE, D. H.; SCHELL, W. A.; MITCHELL, T. G. *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, and other dimorphic fungi causing systemic mycoses. In MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFATTER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington: ASM Press., p. 1781-1797, 2003.

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

WANKE, B.; LAZERA, M.; MONTEIRO, P. C.; LIMA, F. C.; LEAL, M. J.; FERREIRA FILHO, P. L.; KAUFMAN, L.; PINNER, R. W.; AJELLO, L. Investigation of an outbreak of endemic coccidioidomycosis in Brazil's northeastern state of Piauí with a review of the occurrence and distribution of *Coccidioides immitis* in three other Brazilian states. **Myopathologia**, v. 148, n. 2, p. 57-67, 1999.

WARNOCK, D. W. *Coccidioides* species as potential agents of bioterrorism. **Future Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 277-283, 2007.

WHEAT, L. J. Nonculture diagnostic methods for invasive fungal infections. **Current Infectious Disease Reports**, v. 9, n. 6, p. 465-471, 2007.

WHEAT, L. J.; CONNOLLY, P.; SMEDEMA, M.; DURKIN, M.; BRIZENDINE, E.; MANN, P.; PATEL, R.; MCNICHOLAS, P. M.; GOLDMAN, M. Activity of newer triazoles against *Histoplasma capsulatum* from patients with AIDS who failed fluconazole. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 1235-1239, 2006.

WHEAT, L. J.; FREIFELD, A. G.; KLEIMAN, M. B.; BADDLEY, J. W.; MCKINSEY, D. S.; LOYD, J. E.; KAUFFMAN, C. A. Clinical Practice Guidelines for the Management of Patients with Histoplasmosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, n. 45, p. 807-825, 2007.

WHEAT, L. J.; KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 17, p. 1-19, 2003.

WOODS, J. P. *Histoplasma capsulatum* Molecular Genetics, Pathogenesis, and Responsiveness to Its Environment. **Fungal Genetics and Biology**, n. 35, p. 81-97, 2002.

YEO, S. F.; WONG, B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 3, p. 465-484, 2002.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; MUNIZ, M. M.; WANKE, B. Histoplasmose. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1208-1221, 2005.

APÊNDICE

CORANTES, SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

1. CORANTES

1.1 Lactofenol azul-algodão

Objetivo

Fluido de montagem entre lâmina-lamínula para examinar a micromorfologia das colônias fúngicas.

Composição

Ácido láctico	20 g
Fenol	20 g
Glicerina	20 g
Azul-algodão	0,05 g
Água destilada	20 mL

Modo de preparo

- 1) Fundir os cristais de fenol e juntar com as demais substâncias;
- 2) Esperar 24 horas e filtrar com papel-filtro;
- 3) Acondicionar em um frasco conta-gotas de cor âmbar;
- 4) Utilizar o corante colocando 2 gotas sobre uma lâmina de microscopia limpa, acrescentando em seguida um pequeno fragmento da colônia fúngica de interesse, imergindo-o no líquido. Cobrir com uma lamínula e observar ao microscópio óptico na objetiva de 40x.

2. SOLUÇÕES

2.1 Solução salina

Objetivo

Usada no preparo de inóculo fúngico.

Composição

Cloreto de sódio	0,9 g
Água destilada	100 mL

Modo de preparo

- 1) Adicionar o cloreto de sódio a água destilada, homogeneizando até sua completa dissolução;
- 2) Autoclavar por 15 minutos, a 121°C;
- 3) Estocar a 4°C.

2.2 MOPS (ácido 2-[N-morfolino] propanosulfônico)

Objetivo

Usado para o ajuste de pH de soluções, em especial o meio RPMI 1640.

Composição

MOPS	6,9 g
Água destilada	200 mL

Modo de preparo

- 1) Dissolver o MOPS em água destilada autoclavada;
- 2) Armazenar a 4°C em garrafa envolvida com papel alumínio.

2.3 DMSO (dimetil sulfoxido)

Objetivo

Usado no preparo de soluções de algumas drogas antifúngicas.

Composição

DMSO	50 mL
------	-------

Modo de preparo

- 1) Autoclavar por 15 minutos, a 121°C;
- 2) Estocar a 4°C.

3. MEIOS DE CULTURA

3.1 Ágar Batata

Objetivo

Usado para realização de repiques de colônias fúngicas e para o estoque de cepas fúngicas.

Composição

Infusão de batatas	500 mL
Dextrose	10 g
Ágar bacteriológico	15 g
Água destilada	1000 mL

Modo de preparo

- 1) Cozinhar 250 g de batata-inglesa (*Solanum tuberosum*) descascadas em 500 mL de água, por 1h;
- 2) Filtrar a infusão de batatas através de gaze;
- 3) Restituir o volume inicial de água (500 mL) e acrescentar 500 mL de água destilada;
- 4) Adicionar o ágar e a dextrose, dissolvendo os completamente;

- 5) Autoclavar o meio por 15 minutos a 121°C e distribuir, alíquotas de 4 mL, em tubos de ensaio;
- 6) Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de aproximadamente 6 cm.

3.2 Ágar BHI (*Brain Heart Infusion*)

Objetivo

Usado para isolamento primário de fungos que necessitam de meio enriquecido para seu desenvolvimento, especialmente os fungos dimórficos.

Composição

Cérebro-coração, infusão de sólidos	8,0 g
Hidrolisado péptico de tecido animal	5,0 g
Hidrolisado pancreático de caseína	16,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Glucose	2,0 g
Fosfato dissódico de hidrogênio	2,5 g
Ágar	13,5 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

Modo de preparo

- 1) Preparar conforme indicação do fabricante, dissolvendo os componentes em água destilada;
- 2) Autoclavar o meio por 15 minutos a 121°C e distribuir, alíquotas de 4 mL, em tubos de ensaio;
- 3) Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de aproximadamente 6 cm.

3.3 Ágar Sabouraud a 2%

Objetivo

É o principal meio de cultura usado na Micologia. Utiliza-se para o cultivo primário geral dos fungos (leveduras, filamentosos a alguns dimórficos).

Composição

Peptona	10 g
Dextrose	20 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada	1000 mL

Modo de preparo

- 1) Dissolver ágar, peptona e dextrose em água destilada, aquecendo em banho-maria;
- 2) Autoclavar por 15 minutos, a 121°C;
- 3) Distribuir alíquotas de 4 mL em tubos de ensaio, deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de 6 cm.

3.4 Ágar Sabouraud a 2% ou Ágar BHI com Sangue**Objetivo**

Utilizados especialmente para a reversão de fungos dimórficos.

Composição

Ágar Sabouraud a 2% ou ágar BHI 50 mL

Sangue de carneiro desfibrinado 5 mL

Modo de preparo

- 1) Preparar 50 mL de ágar Sabouraud a 2% ou ágar BHI, autoclavar e deixar resfriar, até atingir a temperatura de 48°C;
- 2) Adicionar o sangue, homogeneizar e distribuir alíquotas de 4 mL em tubos de ensaio;
- 3) Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de 6 cm.

3.5 RPMI 1640**Objetivo**

Meio de cultura padronizado pelo CLSI, para execução de testes de sensibilidade a antifúngicos, através da técnica de microdiluição ou macrodiluição em caldo (documento M-27A, aprovado em 1997).

Composição

RPMI 1640 (com glutamina e sem bicarbonato de sódio) 10,5 g

Água destilada 1000 mL

Modo de preparo

- 1) Dissolver o meio em água destilada;
- 2) Ajustar o pH final para 7,0 (com solução de MOPS);
- 3) Completar o volume com água destilada e esterilizar o meio por filtração em membrana de 0,22 µm de poro, utilizando pressão positiva;
- 4) Manter sob refrigeração até o momento do uso.

ANEXO I

TABELAS

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e anfotericina B isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de *C. posadasii*.

Cepa	CIM - drogas isoladas		CIM - drogas em combinação		FIC CIP	FIC AMB	FICI Index	Resultado
	CIP	AMB	CIP	AMB				
1	100	0,125	50	0,125	0,5	1	1,5	I
2	100	0,125	50	0,125	0,5	1	1,5	I
3	100	0,125	25	0,0625	0,25	0,5	0,75	I
4	100	0,125	25	0,0625	0,25	0,5	0,75	I
5	100	0,125	50	0,125	0,5	1	1,5	I
6	100	0,0625	50	0,0625	0,5	1	1,5	I
7	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
8	100	0,125	50	0,125	0,5	1	1,5	I
9	100	0,125	50	0,125	0,5	1	1,5	I
10	100	0,125	25	0,0625	0,25	0,5	0,75	I
11	100	0,125	25	0,0625	0,25	0,5	0,75	I
12	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
13	100	0,0625	25	0,0312	0,25	0,5	0,75	I
14	100	0,125	25	0,0625	0,25	0,5	0,75	I
15	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
16	100	0,0625	50	0,0625	0,5	1	1,5	I

Legenda: CIP = ciprofloxacina; AMB = anfotericina B; S = sinergismo; I = indiferente.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e itraconazol isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de *C. posadasii*.

Cepa	CIM - drogas isoladas		CIM - drogas em combinação		FIC CIP	FIC ITC	FICI Index	Resultado
	CIP	ITC	CIP	ITC				
1	100	0,125	50	0,125	0,5	1	1,5	I
2	100	0,125	6,25	0,0156	0,0625	0,125	0,1875	S
3	100	0,25	6,25	0,0312	0,0625	0,125	0,1875	S
4	100	0,125	3,125	0,0078	0,0312	0,0625	0,0937	S
5	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
6	100	0,125	25	0,0625	0,25	0,5	0,75	I
7	100	0,125	50	0,125	0,5	1	1,5	I
8	100	0,5	12,5	0,125	0,125	0,25	0,375	S
9	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
10	100	0,25	6,25	0,0312	0,0625	0,125	0,1875	S
11	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
12	100	0,125	6,25	0,0156	0,0625	0,125	0,1875	S
13	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
14	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
15	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
16	100	0,25	12,5	0,0625	0,125	0,25	0,375	S

Legenda: CIP = ciprofloxacina; ITC = itraconazol; S = sinergismo; I = indiferente.

Tabela 5. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e voriconazol isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de *C. posadasii*.

Cepa	CIM - drogas isoladas		CIM - drogas em combinação		FIC CIP	FIC VRC	FICI Index	Resultado
	CIP	VRC	CIP	VRC				
1	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
2	100	0,125	25	0,0625	0,25	0,5	0,75	I
3	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
4	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
5	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
6	100	0,125	50	0,125	0,5	1	1,5	I
7	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
8	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
9	100	0,125	25	0,0625	0,25	0,5	0,75	I
10	100	0,25	6,25	0,0312	0,0625	0,125	0,1875	S
11	100	0,25	3,125	0,0156	0,0312	0,0625	0,0937	S
12	100	0,125	3,125	0,0078	0,0312	0,0625	0,0937	S
13	100	0,125	6,25	0,0156	0,0625	0,125	0,1875	S
14	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
15	100	0,125	12,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
16	100	0,25	6,25	0,0312	0,0625	0,125	0,1875	S

Legenda: CIP = ciprofloxacina; VRC = voriconazol; S = sinergismo; I = indiferente.

Tabela 6. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e caspofungina isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de *C. posadasii*.

Cepa	CIM - drogas isoladas		CIM - drogas em combinação		FIC CIP	FIC CAS	FICI Index	Resultado
	CIP	CAS	CIP	CAS				
1	100	32	12,5	8	0,125	0,25	0,375	S
2	100	32	12,5	8	0,125	0,25	0,375	S
3	100	32	12,5	8	0,125	0,25	0,375	S
4	100	16	12,5	4	0,125	0,25	0,375	S
5	100	16	6,25	2	0,0625	0,125	0,1875	S
6	100	32	25	16	0,25	0,5	0,75	I
7	100	16	50	16	0,5	1	1,5	I
8	100	32	3,125	2	0,0312	0,0625	0,0937	S
9	100	32	12,5	8	0,125	0,25	0,375	S
10	100	32	12,5	8	0,125	0,25	0,375	S
11	100	32	3,125	2	0,0312	0,0625	0,0937	S
12	100	32	12,5	8	0,125	0,25	0,375	S
13	100	32	6,25	4	0,0625	0,125	0,1875	S
14	100	32	6,25	4	0,0625	0,125	0,1875	S
15	100	32	12,5	8	0,125	0,25	0,375	S
16	100	32	12,5	8	0,125	0,25	0,375	S

Legenda: CIP = ciprofloxacina; CAS = caspofungina; S = sinergismo; I = indiferente.

Tabela 7. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e anfotericina B isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de *H. capsulatum* (fase filamentosa).

Cepa	CIM - drogas isoladas		CIM - drogas em combinação		FIC CIP	FIC AMB	FICI Index	Resultado
	CIP	AMB	CIP	AMB				
1	500	0,25	125	0,125	0,25	0,5	0,75	I
2	500	0,25	250	0,25	0,5	1	1,5	I
3	500	0,5	31,25	0,0625	0,0625	0,125	0,1875	S
4	500	0,25	62,5	0,0625	0,125	0,25	0,375	S
5	500	0,25	125	0,125	0,25	0,5	0,75	I
6	500	0,25	125	0,125	0,25	0,5	0,75	I
7	500	0,125	125	0,0625	0,25	0,5	0,75	I
8	500	0,25	125	0,125	0,25	0,5	0,75	I
9	500	0,125	125	0,0625	0,25	0,5	0,75	I
10	500	0,25	62,5	0,0625	0,125	0,25	0,375	S
11	500	0,0078	250	0,0078	0,5	1	1,5	I
12	500	0,25	250	0,25	0,5	1	1,5	I
13	500	0,25	125	0,125	0,25	0,5	0,75	I
14	500	0,125	31,25	0,0156	0,0625	0,125	0,1875	S
15	500	0,125	62,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
16	500	0,0625	62,5	0,0156	0,125	0,25	0,375	S

Legenda: CIP = ciprofloxacina; AMB = anfotericina B; S = sinergismo; I = indiferente.

Tabela 8. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e itraconazol isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de *H. capsulatum* (fase filamentosa).

Cepa	CIM - drogas isoladas		CIM - drogas em combinação		FIC CIP	FIC ITC	FICI Index	Resultado
	CIP	ITC	CIP	ITC				
1	500	0,0312	62,5	0,0078	0,125	0,25	0,375	S
2	500	0,0312	62,5	0,0078	0,125	0,25	0,375	S
3	500	0,0312	62,5	0,0078	0,125	0,25	0,375	S
4	500	0,0039	62,5	0,000975	0,125	0,25	0,375	S
5	500	0,0312	125	0,0156	0,25	0,5	0,75	I
6	500	0,0039	62,5	0,000975	0,125	0,25	0,375	S
7	500	0,0078	62,5	0,00195	0,125	0,25	0,375	S
8	500	0,0156	125	0,0078	0,25	0,5	0,75	I
9	500	0,0156	62,5	0,0039	0,125	0,25	0,375	S
10	500	0,0156	15,625	0,000975	0,0312	0,0625	0,0937	S
11	500	0,0156	62,5	0,0039	0,125	0,25	0,375	S
12	500	0,0156	62,5	0,0039	0,125	0,25	0,375	S
13	500	0,0312	62,5	0,0078	0,125	0,25	0,375	S
14	500	0,0156	62,5	0,0039	0,125	0,25	0,375	S
15	500	0,0039	62,5	0,000975	0,125	0,25	0,375	S
16	500	0,0039	3,906	0,00006	0,0078	0,0154	0,0232	S

Legenda: CIP = ciprofloxacina; ITC = itraconazol; S = sinergismo; I = indiferente.

Tabela 9. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e voriconazol isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de *H. capsulatum* (fase filamentosa).

Cepa	CIM - drogas isoladas		CIM - drogas em combinação		FIC CIP	FIC VRC	FICI Index	Resultado
	CIP	VRC	CIP	VRC				
1	500	0,125	62,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
2	500	0,25	62,5	0,0625	0,125	0,25	0,375	S
3	500	0,25	62,5	0,0625	0,125	0,25	0,375	S
4	500	0,125	31,25	0,0156	0,0625	0,125	0,1875	S
5	500	0,25	31,25	0,0312	0,0625	0,125	0,1875	S
6	500	0,25	62,5	0,0625	0,125	0,25	0,375	S
7	500	0,125	31,25	0,0156	0,0625	0,125	0,1875	S
8	500	0,25	31,25	0,0312	0,0625	0,125	0,1875	S
9	500	0,25	31,25	0,0312	0,0625	0,125	0,1875	S
10	500	0,5	31,25	0,0625	0,0625	0,125	0,1875	S
11	500	0,5	62,5	0,125	0,125	0,25	0,375	S
12	500	0,5	62,5	0,125	0,125	0,25	0,375	S
13	500	0,5	62,5	0,125	0,125	0,25	0,375	S
14	500	0,125	62,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
15	500	0,125	62,5	0,0312	0,125	0,25	0,375	S
16	500	0,0625	62,5	0,0156	0,125	0,25	0,375	S

Legenda: CIP = ciprofloxacina; VRC = voriconazol; S = sinergismo; I = indiferente.

Tabela 10. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e caspofungina isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de *H. capsulatum* (fase filamentosa).

Cepa	CIM - drogas isoladas		CIM - drogas em combinação		FIC CIP	FIC CAS	FICI Index	Resultado
	CIP	CAS	CIP	CAS				
1	500	8	62,5	2	0,125	0,25	0,375	S
2	500	4	125	2	0,25	0,5	0,75	I
3	500	0,5	125	0,25	0,25	0,5	0,75	I
4	500	4	125	2	0,25	0,5	0,75	I
5	500	0,25	125	0,125	0,25	0,5	0,75	I
6	500	2	31,25	0,25	0,0625	0,125	0,1875	S
7	500	1	62,5	0,25	0,125	0,25	0,375	S
8	500	4	31,25	0,5	0,0625	0,125	0,1875	S
9	500	8	125	4	0,25	0,5	0,75	I
10	500	2	31,25	0,25	0,0625	0,125	0,1875	S
11	500	4	31,25	0,5	0,0625	0,125	0,1875	S
12	500	4	1,95	0,0312	0,0039	0,0078	0,0117	S
13	500	4	125	2	0,25	0,5	0,75	I
14	500	4	125	2	0,25	0,5	0,75	I
15	500	8	15,625	0,5	0,0312	0,0625	0,0937	S
16	500	2	62,5	0,5	0,125	0,25	0,375	S

Legenda: CIP = ciprofloxacina; CAS = caspofungina; S = sinergismo; I = indiferente.

Tabela 11. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e anfotericina B isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de *H. capsulatum* (fase leveduriforme).

Cepa	CIM - drogas isoladas		CIM - drogas em combinação		FIC CIP	FIC AMB	FICI Index	Resultado
	CIP	AMB	CIP	AMB				
1	250	0,5	62,5	0,125	0,25	0,25	0,5	S
2	500	0,25	125	0,125	0,25	0,5	0,75	I
3	250	0,0625	250	0,0625	1	1	2	I
4	125	0,25	62,5	0,125	0,5	0,5	1	I
5	250	0,0156	250	0,0156	1	1	2	I
6	250	0,125	125	0,0625	0,5	0,5	1	I
7	125	0,0625	125	0,0625	1	1	2	I
8	250	0,125	125	0,0625	0,5	0,5	1	I
9	62,5	0,125	31,25	0,0625	0,5	0,5	1	I

Legenda: CIP = ciprofloxacina; AMB = anfotericina B; S = sinergismo; I = indiferente.

Tabela 12. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e itraconazol isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de *H. capsulatum* (fase leveduriforme).

Cepa	CIM - drogas isoladas		CIM - drogas em combinação		FIC CIP	FIC ITC	FICI Index	Resultado
	CIP	ITC	CIP	ITC				
1	250	0,0078	125	0,0039	0,5	0,5	1	I
2	500	0,0039	250	0,0039	0,5	1	1,5	I
3	250	0,0312	62,5	0,0078	0,25	0,25	0,5	S
4	125	0,0156	31,25	0,0039	0,25	0,25	0,5	S
5	250	0,0312	125	0,0156	0,5	0,5	1	I
6	250	0,0156	125	0,0078	0,5	0,5	1	I
7	125	0,0156	31,25	0,0039	0,25	0,25	0,5	S
8	250	0,0312	125	0,0156	0,5	0,5	1	I
9	62,5	0,0156	31,25	0,0078	0,5	0,5	1	I

Legenda: CIP = ciprofloxacina; ITC = itraconazol; S = sinergismo; I = indiferente.

Tabela 13. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e voriconazol isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de *H. capsulatum* (fase leveduriforme).

Cepa	CIM - drogas isoladas		CIM - drogas em combinação		FIC CIP	FIC VRC	FICI Index	Resultado
	CIP	VRC	CIP	VRC				
1	250	0,0312	62,5	0,0078	0,25	0,25	0,5	S
2	500	0,0156	125	0,0078	0,25	0,5	0,75	I
3	250	0,0078	250	0,0078	1	1	2	I
4	125	0,0078	62,5	0,0039	0,5	0,5	1	I
5	250	0,00195	250	0,00195	1	1	2	I
6	250	0,0312	250	0,0312	1	1	2	I
7	125	0,0039	125	0,0039	1	1	2	I
8	250	0,00195	250	0,00195	1	1	2	I
9	62,5	0,00195	62,5	0,00195	1	1	2	I

Legenda: CIP = ciprofloxacina; VRC = voriconazol; S = sinergismo; I = indiferente.

Tabela 14. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das drogas ciprofloxacina e caspofungina isoladas e em combinação e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de *H. capsulatum* (fase leveduriforme).

Cepa	CIM - drogas isoladas		CIM - drogas em combinação		FIC CIP	FIC CAS	FICI Index	Resultado
	CIP	CAS	CIP	CAS				
1	250	2	62,5	0,5	0,25	0,25	0,5	S
2	500	2	62,5	0,5	0,125	0,25	0,375	S
3	250	1	62,5	0,25	0,25	0,25	0,5	S
4	125	2	62,5	1	0,5	0,5	1	I
5	250	1	250	1	1	1	2	I
6	250	1	250	1	1	1	2	I
7	125	0,5	125	0,5	1	1	2	I
8	250	2	62,5	0,5	0,25	0,25	0,5	S
9	62,5	2	31,25	1	0,5	0,5	1	I

Legenda: CIP = ciprofloxacina; CAS = caspofungina; S = sinergismo; I = indiferente.

Tabela 15. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) da combinação de ciprofloxacina em baixa concentração e anfotericina B e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de *C. posadasii*.

Cepa	CIM - drogas isoladas		CIM - drogas em combinação		FIC CIP	FIC AMB	FICI Index	Resultado
	CIP	AMB	CIP	AMB				
1	100	0,125	2,5	0,0312	0,025	0,25	0,275	S
2	100	0,125	1,25	0,0156	0,0125	0,125	0,1375	S
3	100	0,125	0,625	0,0078	0,00625	0,0625	0,06875	S
4	100	0,125	2,5	0,0312	0,025	0,25	0,275	S
5	100	0,125	2,5	0,0312	0,025	0,25	0,275	S
6	100	0,0625	2,5	0,0156	0,025	0,25	0,275	S
7	100	0,125	10	0,125	0,1	1	1,1	I
8	100	0,125	5	0,0625	0,05	0,5	0,55	I
9	100	0,125	2,5	0,0312	0,025	0,25	0,275	S
10	100	0,125	1,25	0,0156	0,0125	0,125	0,1375	S
11	100	0,125	1,25	0,0156	0,0125	0,125	0,1375	S
12	100	0,125	1,25	0,0156	0,0125	0,125	0,1375	S
13	100	0,0625	2,5	0,0156	0,025	0,25	0,275	S
14	100	0,125	1,25	0,0156	0,0125	0,125	0,1375	S
15	100	0,125	2,5	0,0312	0,025	0,25	0,275	S
16	100	0,0625	5	0,0312	0,05	0,5	0,55	I

Legenda: CIP = ciprofloxacina; AMB = anfotericina B; S = sinergismo; I = indiferente.

Tabela 16. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) da combinação de ciprofloxacina em baixa concentração e anfotericina B e índice da concentração inibitória fracionária (FICI) frente a cepas de *H. capsulatum* (fase filamentosa).

Cepa	CIM - drogas isoladas		CIM - drogas em combinação		FIC CIP	FIC AMB	FICI Index	Resultado
	CIP	AMB	CIP	AMB				
1	500	0,5	50	0,25	0,1	0,5	0,6	I
2	500	0,5	50	0,25	0,1	0,5	0,6	I
3	500	0,25	50	0,125	0,1	0,5	0,6	I
4	500	0,25	50	0,125	0,1	0,5	0,6	I
5	500	0,125	100	0,125	0,2	1	1,2	I
6	500	0,0312	100	0,0312	0,2	1	1,2	I
7	500	0,0312	25	0,0078	0,05	0,25	0,3	S
8	500	0,0312	100	0,0312	0,2	1	1,2	I
9	500	0,0312	100	0,0312	0,2	1	1,2	I
10	500	0,125	100	0,125	0,2	1	1,2	I
11	500	0,125	100	0,125	0,2	1	1,2	I
12	500	0,5	25	0,125	0,05	0,25	0,3	S
13	500	0,125	50	0,0625	0,1	0,5	0,6	I
14	500	0,25	50	0,125	0,1	0,5	0,6	I
15	500	0,125	100	0,125	0,2	1	1,2	I
16	500	0,25	50	0,125	0,1	0,5	0,6	I

Legenda: CIP = ciprofloxacina; AMB = anfotericina B; S = sinergismo; I = indiferente.

ANEXO II

ARTIGO

----- Mensagem original -----

De: nlin@asmusa.org <nlin@asmusa.org>

Assunto: Manuscript submission (AAC00364-11 Version 1)

Para: samiamic@yahoo.com.br

Cc: samiamic@yahoo.com.br

Data: Quinta-feira, 17 de Março de 2011, 19:02

Re: Ciprofloxacin acts synergistically *in vitro* with classical antifungal drugs on *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Coccidioides posadasii* (AAC00364-11 Version 1)

Dear Dr. Brilhante:

You have successfully submitted your manuscript via the Rapid Review system. The control number of your manuscript is AAC00364-11 Version 1. Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals Department or with the editor. You may log onto the Rapid Review system at any time to see the current status of your manuscript and the name of the editor handling it. The URL is <http://www.rapidreview.com/ASM2/author.html>. To find contact information for the editor handling your manuscript, go to the following URL: http://www.asm.org//components/com_php/files/editors.php.

In submitting your manuscript to Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC), the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has not been submitted or published elsewhere and that all of the authors are aware of and agree to the submission.

By publishing in the journal, the authors agree that any DNAs, viruses, microbial strains, mutant animal strains, cell lines, antibodies, and similar materials newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion, at reasonable cost, and in limited quantities to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

Similarly, the authors agree to make available computer programs, originating in the authors' laboratory, that are the only means of confirming the conclusions reported in the article but that are not available commercially. The program(s) and suitable documentation regarding its (their) use may be provided by any of the following means: (i) as a program transmitted via the Internet, (ii) as an Internet server-based tool, or (iii) as a compiled or assembled form on a suitable medium (e.g., magnetic or optical). It is expected that the material will be provided in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

If your manuscript is accepted for publication, a condition of acceptance is that you assign copyright to the American Society for Microbiology. A copyright transfer agreement is sent with each letter of acceptance after the manuscript has been scheduled for publication.

Thank you for submitting your manuscript for consideration.

Noel Lin

Production Editor

Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC)

Antimicrobial Agents and Chemotherapy – Short-form Paper**Ciprofloxacin acts synergistically *in vitro* with classical antifungal drugs on *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Coccidioides posadasii***

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante^{1,2*}, Erica Pacheco Caetano¹, José Júlio Costa Sidrim^{1,2},
Rossana de Aguiar Cordeiro^{1,2}, Zoilo Pires de Camargo⁵, Maria Auxiliadora Bezerra
Fechine², Rita Amanda Chaves de Lima¹, Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia¹,
Jacó Ricarte Lima Mesquita⁶, Daniel Teixeira Lima¹, André Jalles Monteiro⁴, Marcos Fábio
Gadelha Rocha^{1,3}

¹ Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

² Postgraduate Program in Medical Sciences, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

³ Postgraduate Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

⁴ Department of Statistics and Applied Mathematics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

⁵ Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, São Paulo Federal University, São Paulo, Brazil.

⁶ São José Hospital, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Running Title: Effect of ciprofloxacin on dimorphic fungi

Corresponding author: R.S.N. Brilhante. Rua Barão de Canindé, 210; Montese. CEP: 60.425-540. Fortaleza, CE, Brazil. Fax: 55 (85) 3295-1736 E. mail: brilhante@ufc.br.

Abstract

This study evaluated the *in vitro* interaction between ciprofloxacin and classical antifungals against mycelial and yeast-like *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Coccidioides posadasii*. It was conducted through broth microdilution and macrodilution, according to CLSI. Mainly, synergistic interactions were observed for the associations between ciprofloxacin and itraconazole, ciprofloxacin and voriconazole and ciprofloxacin and

caspofungin against mycelial *H. capsulatum* and *C. posadasii*. The present study provides perspectives for new therapeutic strategies against these pathogens.

Keywords: *H. capsulatum*, *C. posadasii*, ciprofloxacin, antifungal drugs, synergism.

Classical histoplasmosis and coccidioidomycosis are deep mycoses endemic to the American continent (7, 8), which are caused by the dimorphic fungi *Histoplasma capsulatum* and *Coccidioides posadasii*, respectively (5, 10).

Although common antifungal therapies are efficient to treat these mycoses (1, 10), refractory cases and relapses have been described in patients with disseminated disease (2, 18). Therefore, the pursuit of new therapeutic strategies against these pathogens has become more relevant.

This research evaluated the *in vitro* interaction between ciprofloxacin (CIP) and amphotericin B (AMB), itraconazole (ITC), voriconazole (VRC) or caspofungin (CAS) against *H. capsulatum* and *C. posadasii*.

For such, *H. capsulatum* isolates, in mycelial (HcM) (n=16) and yeast-like forms (HcY) (n=6), and *C. posadasii* (n=16), from the culture collection of the Specialized Medical Mycology Center of Federal University of Ceará, were included in this study. The strains were handled within a class II biosafety cabinet, in a biosafety level 3 laboratory.

Inocula of HcM and *C. posadasii* were prepared after growing the strains in mycelial phase for seven days at 28°C. Then, sterile saline was added to each culture tube, mycelial surface was scraped with a swab and the content was transferred to a sterile tube. In order to obtain HcY, isolates were grown onto BHI agar with sheep blood (10%), at 35°C, and were maintained through weekly passages. The supernatant was read at 530 nm and adjusted to 95% transmittance. Then, the suspensions were diluted to obtain inocula of 0.5×10^3 to 2.5×10^4 CFU/mL for *H. capsulatum* and 10^3 to 5×10^3 CFU/mL for *C. posadasii* (3, 4).

Susceptibility tests were carried out as described by Brilhante et al. (3) for *H. capsulatum* and Cordeiro et al. (4) for *C. posadasii*. Initially, MICs for each drug isolatedly were determined. Then, these MICs were used as the highest concentration for each drug during combination assays. The concentration range for each drug when combined was CIP (Fresenius Kabi, Brazil) (0.488-250 µg/mL), AMB (Sigma Chemical Corporation, USA) (0.000015-0.5 µg/mL), ITC (Janssen Pharmaceutica, Belgium) (0.0000075-0.0312 µg/mL), VRC (Pfizer Pharmaceuticals, USA) (0.00012-0.5 µg/mL) and CAS (Merck Sharp & Dohme,

Brazil) (0.00048-8 µg/mL) against HcM. Against HcY, drug concentrations were CIP (0.244-250 µg/mL), AMB (0.00012-0.5 µg/mL), ITC (0.0000075-0.0312 µg/mL), VRC (0.0000038-0.0312 µg/mL) and CAS (0.00097-2 µg/mL). As for *C. posadasii*, the concentration ranges were CIP (3.125-50 µg/mL), AMB (0.0039-0.125 µg/mL), ITC (0.0078-0.5 µg/mL), VRC (0.0078-0.25 µg/mL) and CAS (1-32 µg/mL).

The interaction between low concentrations of CIP (LowCIP) and AMB within the previously described concentration range was also evaluated (14), using the following intervals of concentration for CIP: 0.195-100 µg/mL against HcM and 0.625-10 µg/mL against *C. posadasii*.

For all combination assays, MICs were defined as the lowest concentration capable of inhibiting 80% of visible fungal growth, when compared to the drug-free control (3, 6). Drug interaction was evaluated by calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI), which was classified as synergistic ($FICI \leq 0.5$), indifferent ($0.5 < FICI < 4$) or antagonistic ($FICI \geq 4$) (12). Obtained FICI values for each drug combination against *H. capsulatum* and *C. posadasii* were compared through Wilcoxon test ($P < 0.05$). Standard strains *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were included as controls.

All strains were susceptible to antifungal drugs isolatedly. Ciprofloxacin inhibited 5/6 HcY strains ($125 < MIC < 250$ mg/mL), being ineffective against HcM and *C. posadasii*. Thus, the highest CIP concentration tested against these fungi was also used as the highest concentration for drug combination assays. No antagonistic interactions were observed in this research (Table 1). The main synergistic interactions were observed when associating CIP and ITC or VRC or CAS against HcM, for which values of FICI were significantly smaller than those for CIP and AMB (ITC $P=0.0073$; VRC $P=0.0051$; CAS $P=0.0458$). As for *C. posadasii*, synergistic interactions were observed for the combinations between CIP and ITC or VRC or CAS, whose FICI values were also significantly smaller than those for CIP and AMB (ITC $P=0.0088$; VRC $P=0.0014$; CAS $P=0.0073$). The results for HcY were not statistically significant (Table 1).

Combination between low ciprofloxacin concentrations and AMB synergistically interacted against *C. posadasii*, for which FICI values were smaller than those for the association of CIP (high concentration) and AMB ($P=0.0022$). On the other hand, this combination presented no statistical significance against HcM (Table 1).

Quinolones have been shown to improve *in vitro* effects of antifungal drugs against yeast and mold species (11, 14). In addition, the association of CIP and FLC was shown

effective in treating invasive candidiasis and pulmonary mucormycosis in murine models (16, 17). However, the combination of CIP and classical antifungals has never been tested *in vitro* nor *in vivo* against dimorphic fungi.

Although typically not presenting antifungal activity (14), CIP is able to bind to fungal topoisomerase II (9, 13), possibly inhibiting DNA replication. This is only observed when CIP is associated with antifungals, probably because certain antimycotics alter fungal membrane permeability, increasing intracellular levels of this quinolone (15). Additionally, it has been shown that CIP enhances the activity of azoles by overlapping substrate specificity of ATP-binding cassette transporters, which results in higher intracellular concentrations of these antifungal agents (14). These facts could explain the synergy between CIP and azole derivatives observed in this study.

It was suggested that CIP may increase the susceptibility of (1,3)- β -D-glucano sintase to echinocandins (15), justifying the occurrence of synergy between CIP and CAS against *H. capsulatum* and *C. posadasii*, even though echinocandins are not effective against the former (10).

Low concentrations of CIP seem to increase AMB-induced pore formation on fungal cell membranes, producing a synergistic effect, while high concentrations may produce antagonistic effects (14). This dose-dependent interaction between AMB and CIP was demonstrated against *C. albicans* and *Aspergillus fumigatus* (14), which was also observed in this study against *C. posadasii*, but not against HcM.

In conclusion, the data obtained in this study suggest new alternatives for treating histoplasmosis and coccidioidomycosis, providing perspectives for delineating *in vivo* studies.

This research was supported by CAPES-PNPD/Prodoc (Process number: 17392-4) and CNPq (Process numbers: 620160/2008-0 and 475652/2008-8).

References

1. **Ampel, N. M., A. Giblin, J. P. Mourani, and J. N. Galgiani.** 2009. Factors and outcomes associated with the decision to treat primary pulmonary coccidioidomycosis. *Clin. Infect. Dis.* **48**:172–178.
2. **Anstead, G. M., G. Corcoran, J. Lewis, D. Berg, and J. R. Graybill.** 2005. Refractory coccidioidomycosis treated with posaconazole. *Clin. Infect. Dis.* **40**:1770–1776.
3. **Brilhante, R. S. N., M. A. B. Fechine, R. A. Cordeiro, M. F. G. Rocha, J. F. Ribeiro, A. J. Monteiro, R. A. C. Lima, J. R. L. Mesquita, Z. P. Camargo, and J. J. C. Sidrim.** 2010. *In vitro* effect of sulfamethoxazole-trimethoprim against

- Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Antimicrob. Agents Chemother. **54**:3978–3979.
4. **Cordeiro, R. A., R. S. N. Brilhante, M. F. G. Rocha, M. A. B. Fechine, Z. P. Camargo, and J. J. C. Sidrim.** 2006. *In vitro* inhibitory effect of antituberculosis drugs on clinical and environmental strains of *Coccidioides posadasii*. J. Antimicrob. Chemother. **58**:575–579.
 5. **Cordeiro, R. A., R. S. N. Brilhante, M. F. G. Rocha, S. P. Bandeira, M. A. B. Fechine, Z. P. Camargo, and J. J. C. Sidrim.** 2009. Twelve years of coccidioidomycosis in Ceará State, Northeast Brazil: epidemiologic and diagnostic aspects. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **66**:65–72.
 6. **Cordeiro, R. A., R. S. N. Brilhante, M. F. G. Rocha, D. J. A. Medrano, A. J. Monteiro, J. L. Tavares, R. A. C. Lima, Z. P. Camargo, and J. J. C. Sidrim.** 2009. *In vitro* synergistic effects of antituberculous drugs plus antifungals against *Coccidioides posadasii*. Int. J. Antimicrob. Agents **34**:278–280.
 7. **Ferreira, M. S., and A. S. Borges.** 2009. Histoplasmosis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. **42**:192–198.
 8. **Fisher, M. C., G. L. Koenig, T. J. White, and J. W. Taylor.** 2002. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. Mycologia **94**:73–84.
 9. **Fostel, J., D. Montgomery, and P. Lartey.** 1996. Comparison of responses of DNA topoisomerase I from *Candida albicans* and human cells to four new agents which stimulate topoisomerase-dependent DNA nicking. FEMS Microbiol. Lett. **138**:105–111.
 10. **Kauffman, C. A.** 2009. Histoplasmosis. Clin. Chest Med. **30**:217–225.
 11. **Nakajima, R., A. Kitamura, K. Someya, M. Tanaka, and K. Sato.** 1995. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of DU-6859a, a fluoroquinolone, in combination with amphotericin B and fluconazole against pathogenic fungi. Antimicrob. Agents Chemother. **39**:1517–1521.
 12. **Odds, F. C.** 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. J. Antimicrob. Chemother. **52**:1.
 13. **Shen, L. L., and J. M. Fostel.** 1994. DNA topoisomerase inhibitors as antifungal agents. Adv. Pharmacol. **29**:227–244.
 14. **Stergiopoulou, T., J. Meletiadis, T. Sein, P. Papaioannidou, I. Tsiouris, E. Roilides, and T. J. Walsh.** 2008. Isobolographic analysis of pharmacodynamic

- interactions between antifungal agents and ciprofloxacin against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2196–2204.
15. **Stergiopoulou, T., J. Meletiadis, T. Sein, P. Papaioannidou, I. Tsiouris, E. Roilides, and T. J. Walsh.** 2009. Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**:343–348.
 16. **Sugar, A. M., X. P. Liu, and R. J. Chen.** 1997. Effectiveness of quinolone antibiotics in modulating the effects of antifungal drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2518–2521.
 17. **Sugar, A. M.; and X. P. Liu.** 2000. Combination antifungal therapy in treatment of murine pulmonary mucormycosis: roles of quinolones and azoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2004–2006.
 18. **Wheat, L. J., P. Connolly, M. Smedema, M. Durkin, E. Brizendine, P. Mann, R. Patel, P. M. McNicholas, and M. Goldman.** 2006. Activity of newer triazoles against *Histoplasma capsulatum* from patients with AIDS who failed fluconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**:1235–1239.

Table 1. Effects of the combination of ciprofloxacin and the antifungals amphotericin B, azole derivatives and caspofungin on strains of *H. capsulatum*, in mycelial and yeast-like forms, and *C. posadasii*.

Strains	Drugs	MIC – geometric mean (Isolated Antifungals)	MIC – geometric mean (Combined drugs)		FICI geometric mean	Number of strains presenting synergism
			Ciprofloxacin	Antifungal		
Filamentous						
<i>H. capsulatum</i> (16) [‡]						
	CIP / AMB	0.16	96.38	0.06	0.59	6/16
	LowCIP / AMB	0.16	62.09	0.08	0.74	2/16
	CIP / ITC	0.01	52.55	0.002	0.31	14/16
	CIP / VRC	0.21	54.88	0.04	0.30	16/16
	CIP / CAS	2.7	52.55	0.56	0.31	9/16
<i>C. posadasii</i> (16)						
	CIP / AMB	0.10	29.73	0.06	0.89	3/16
	LowCIP / AMB	0.10	2.19	0.024	0.24	13/16
	CIP / ITC	0.15	11.97	0.03	0.35	13/16
	CIP / VRC	0.14	10.97	0.03	0.32	13/16
	CIP / CAS	28.1	10.51	5.9	0.31	14/16
Yeast-like						
<i>H. capsulatum</i> (6)						
	CIP / AMB	0.15	111.3	0.08	1.06	1/6
	CIP / ITC	0.01	78.74	0.005	0.75	3/6
	CIP / VRC	0.007	125	0.004	1.20	1/6
	CIP / CAS	1.41	70.15	0.5	0.67	4/6

[‡]Number of tested strains.